Ročník 1998

SBÍRKA ZÁKONŮ
ČESKÉ REPUBLIKY

Částka 1 **Rozeslána dne 15. ledna 1998** **Cena Kč 2040,–**

O B S A H:

1. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví, kterou se stanoví požadavky na jakost, postup při přípravě, zkoušení, uchovávání a dávkování léčiv (Český lékopis 1997)

1

VYHLÁŠKA

Ministerstva zdravotnictví

ze dne 9. prosince 1997,

kterou se stanoví požadavky na jakost, postup při přípravě, zkoušení, uchovávání a dávkování léčiv (Český lékopis 1997)

Ministerstvo zdravotnictví stanoví po projednání s Ministerstvem zemědělství a Ministerstvem průmyslu a obchodu podle § 75 odst. 4 zákona č. 79/1997 Sb., o léčivech a o změnách a doplnění některých souvisejících zákonů:

§ 1

Český lékopis 1997 se vydává v příloze této vyhlášky. Používá se při přípravě, výrobě a kontrole léčiv.

§ 2

Zrušovací ustanovení

Zrušuje se vyhláška Ministerstva zdravotnictví České socialistické republiky č. 10/1987 Sb., o závaznosti Československého lékopisu – čtvrtého vydání v České socialistické republice, ve znění vyhlášky č. 62/1990 Sb. a vyhlášky č. 376/1991 Sb.

§ 3

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem 1. února 1998.

Ministr:

PhDr. **Stráský** v. r.

Příloha k vyhlášce č. 1/1998 Sb.

ČESKÝ LÉKOPIS 1997

1 Všeobecná část

Úvodní ustanovení **3**

1.1 Úvodní ustanovení

Český lékopis (dále jen "lékopis") obsahuje zejména ustanovení Evropského lékopisu (dále jen Ph. Eur.), při jehož překladu byla dohodnuta česká terminologická konvence pro řadu odborných názvů, které neměly odpovídající české výrazy (imunologie a technologie léčiv). V případech, kdy zavedení české terminologie nemělo řešení, byly přijaty anglické názvy v českém přepisu.

Základní pojmy používané v lékopisu jsou převzaty ze zákona č. 79/1997 Sb. o léčivech a o změnách a doplnění některých souvisejících zákonů.

V lékopisu jsou předmětem jednotlivých článků léčivé látky, pomocné látky, léčivé přípravky, zdravotnický materiál a obaly.

Pod pojmem Výrobek nebo produkt, který se používá v lékopisu, se rozumí předmět lékopisných článků obecně.

Oprávněnou autoritou se v oblasti humánních léčiv rozumí zejména Státní ústav pro kontrolu léčiv a Ministerstvo zdravotnictví ČR, v oblasti veterinárních biopreparátů a léčiv Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv a Ministerstvo zemědělství ČR, v oblasti zabezpečující krizové situace (nouzový stav, stav ohrožení státu a válečný stav) Ministerstvo obrany ČR.

1. Obecné zásady

Obecná ustanovení

Český lékopis vychází z překladu Evropského lékopisu, 3. vydání, a některé texty již z jeho Doplňku 1998. Pouze některé stati a články byly doplněny tak, aby se jejich text přizpůsobil českým podmínkám. Doplněné texty představující "česká specifika" nejsou v rozporu s ustanoveními Evropského lékopisu.

Obecné zásady se týkají všech statí a článků Českého lékopisu 1997. Slovo **"lékopis"** bez bližšího určení znamená **Český lékopis.**

Použití odkazu na název lékopisné obecné stati nebo článku znamená, že metoda, léčivá látka, pomocná látka, léčivý přípravek, zdravotnický materiál nebo obaly vyhovují požadavkům příslušné stati nebo článku. Takové odkazy na články a stati se v lékopisných textech uvádějí *kurzívou*. U obecných statí se odkazy uvádějí většinou zjednodušeně jejich číslem, které je uvedeno v závorce rovněž *kurzívou*.

Léčivý přípravek vyhovuje požadavkům lékopisu po celou dobu své použitelnosti. Předmět jakéhokoliv jiného článku vyhovuje po celou dobu jeho používání. Dobu použitelnosti a datum, od něhož se tato doba počítá, schvaluje oprávněná autorita na základě výsledků stabilitních studií.

Ustanovení článků jsou závazná, pokud není v Obecných zásadách nebo článcích uvedeno jinak. Obecné stati se stávají závaznými, pokud se na ně odkazuje v článku a pokud není takový odkaz učiněn způsobem, který vyjadřuje, že příslušný text, na nějž se odkazuje, není závazný, ale je spíše citován pro informaci nebo poučení.

Léčivé látky, pomocné látky, léčivé přípravky, zdravotnický materiál a obaly popsané v článcích jsou určeny pro humánní a veterinární použití (není-li přesně vymezen jeden z těchto účelů), a pokud nevyhovují některým požadavkům uvedeným v článku, nejsou lékopisné kvality. To však neznamená, že provedení všech zkoušek popsaných v nějakém článku je pro výrobce nezbytnou podmínkou při určení, zda látka před uvolněním do použití vyhovuje lékopisu. Výrobce může získat jistotu, zda nějaký výrobek je lékopisné jakosti, na základě údajů získaných např. z validačních studií výrobního procesu a z průběžných provozních kontrol. Potřeba vyhovět požadavkům lékopisu nevylučuje tedy možnost uchýlit se k parametrickému propouštění výrobků v určitých situacích, které jsou oprávněnou autoritou považovány za vhodné.

Zkoušky na čistotu a stanovení obsahu nebo účinnosti popsané v lékopisu jsou oficiální metody, na nichž jsou založeny lékopisné normy. Se souhlasem oprávněné autority se pro kontrolní účely mohou použít alternativní analytické metody za předpokladu, že bude dosaženo shody s oficiálními metodami. V případě pochybností nebo sporu jsou rozhodující pouze oficiální metody analýzy. Určité látky, které jsou předmětem lékopisného článku, mohou existovat v různé jakosti vhodné pro různé účely. Pokud není v článku uvedeno jinak, požadavky platí pro všechny jakosti této látky. V některých článcích, zejména těch, které se týkají pomocných látek, může být pro informaci a poučení připojen seznam kritických vlastností důležitých pro jejich použití. Zkušební metody pro stanovení jedné nebo více těchto kritických vlastností mohou být uvedeny též pro informaci.

Obecné články na lékové formy se vztahují na všechny přípravky definovaného druhu a nemusí být pro daný léčivý přípravek vyčerpávající. Pro daný léčivý přípravek může oprávněná autorita stanovit dodatečné požadavky k požadavkům uvedeným v obecném článku dané lékové formy.

Konvenční termíny. Výraz "oprávněná autorita" značí obecně národní, nadnárodní nebo mezinárodní orgán nebo organizaci, které mají oprávnění rozhodovat příslušné problémy. Může to být např. národní lékopisná autorita, autorita udělující licence nebo oficiální kontrolní laboratoř. V České republice, viz Úvodní ustanovení (*1.1*).

Výraz "pokud není stanoveno jinak" v Českém lékopise znamená, že požadavky ustanovení platí, pokud oprávněná autorita neschválí změnu nebo výjimku pro určitý zdůvodněný případ.

Ustanovení obsahující výraz "by měl" jsou informativní nebo doporučující.

V některých článcích nebo jiných textech jsou používány termíny "vhodný" nebo "odpovídající" k použití zkoumadla, mikroorganismu, zkušební metody apod.; nejsou-li kritéria vhodnosti popsána v článku, stanoví nebo odsouhlasí tato kritéria oprávněná autorita.

Další ustanovení týkající se obecných statí a článků

Množství

Ve zkouškách na čistotu s číselnými limity a ve stanoveních obsahu se ke zkoušení předepisuje množství, jímž se rozumí množství přibližné. Množství skutečně použité, které se může lišit nejvýše o 10 % od předepsaného množství, se přesně naváží nebo odměří a výsledek se počítá z tohoto přesného množství. Ve zkouškách na čistotu, kde limit není udán číselně, ale obvykle závisí na porovnání a chování porovnávací látky za stejných podmínek, se použije ke zkoušce předepsané množství. Také zkoumadla se používají v předepsaných množstvích.

Množství se naváží nebo odměří s přesností přiměřenou udanému stupni přesnosti. Pro vážení odpovídá přesnost ±5 jednotek za poslední udanou číslicí (např. 0,25 g představuje množství 0,245 až 0,255 g). Pro měření objemu je důležité, zda číslice za desetinnou čárkou je nula, nebo číslo končí nulou (např. 10,0 ml nebo 0,50 ml). V těchto případech se má objem měřit pipetou, odměrnou baňkou nebo byretou podle vhodnosti. Jinak se může použít odměrný válec nebo dělená pipeta. Objemy udané v mikrolitrech se měří mikropipetou nebo injekční mikrostříkačkou. V určitých případech přesnost, s níž jsou množství udávána, neodpovídá počtu platných číslic vyjádřených v udaných číselných požadavcích. Vážení a měření by potom měla být prováděna s dostatečnou přesností v souladu s analytickými zvyklostmi.

Přístroje a postupy

Odměrné skleněné nádoby odpovídají požadavkům třídy A odpovídající mezinárodní normy vydané Mezinárodní organizací pro normalizaci (International Organizsation for Standardization).

Pokud není předepsáno jinak, analytické postupy se provádějí při teplotě 15 °C až 25 °C (pokojová teplota).

Porovnávací zkoušky, pokud není předepsáno jinak, se provádějí za použití stejných zkumavek z bezbarvého neutrálního průhledného skla s plochou základnou a s vnitřním průměrem 16 mm. Stejné objemy porovnávaných kapalin se pozorují shora ve směru podélné osy zkumavky proti bílému pozadí nebo, pokud je to nutné, proti černému pozadí. Zkoušení se provádí v rozptýleném světle.

Jakékoliv rozpouštědlo použité ve zkoušce na čistotu nebo při stanovení obsahu, při kterém se má použít indikátor, se nejdříve neutralizuje na tento indikátor, pokud není předepsána slepá zkouška.

Vodní lázeň

Údaj "vodní lázeň" znamená lázeň vroucí vody, pokud není uvedena jiná teplota vody. Jiné metody zahřívání se mohou použít za předpokladu, že bude dodržena předepsaná teplota zahřívání.

Sušení nebo žíhání do konstantní hmotnosti

Údaje "vysušený do konstantní hmotnosti" a "vyžíhaný do konstantní hmotnosti" znamenají, že dvě následující vážení se neliší o více než 0,5 mg; druhé vážení následuje po další době sušení nebo žíhání přiměřené povaze a množství zbytku.

Pokud je předepsáno sušení za použití jednoho z výrazů "v exsikátoru" nebo "ve vakuu", provádí se za podmínek popsaných ve stati Ztráta sušením (*2.2.32*).

Zkoumadla

Správné provádění analytických postupů popsaných v lékopisu a spolehlivost výsledků závisí částečně na jakosti použitých zkoumadel. Zkoumadla jsou popsána v obecné stati Zkoumadla (*4*). Předpokládá se použití zkoumadel analytického stupně jakosti. Pro některá zkoumadla jsou zařazeny zkoušky na ověření jejich vhodnosti.

Rozpouštědla

Pokud se neuvádí název rozpouštědla, znamená výraz "roztok" vodný roztok. Kde je použití vody předepsáno nebo zahrnuto v analytických postupech popsaných v lékopisu nebo pro přípravu zkoumadel, použije se voda vyhovující požadavkům článku *Aqua purificata*. Výraz "voda destilovaná" označuje čištěnou vodu připravenou destilací.

Termín "ethanol" bez bližšího určení označuje ethanol 99,0%. Výraz "alcohol" bez bližšího určení použitý v Ph. Eur. odpovídá v ČL 97 termínu líh 96% [= 96,0 % (*V/V*) ethanolu (C_2H_6O)]. Jiná ředění ethanolu jsou označena údajem "líh" s vyznačením objemového procenta ethanolu.

Vyjadřování koncentrací

Při vyjadřování koncentrací se výraz "procento" (%) používá podle okolností v jednom ze dvou významů:

- procenta *m/m* (procenta hmotnostní, hmotnost v hmotnosti) udávají počet gramů látky ve 100 g konečného výrobku. V ČL 97 se označení *m/m* obvykle nepoužívá. Pokud není uvedeno, o jaká procenta se jedná, rozumí se procenta hmotnostní.
- procenta *V/V* (procenta objemová, objem v objemu) udávají počet mililitrů látky ve 100 ml konečného výrobku.

Výraz ppm (parts per million) použitý v Ph. Eur. odpovídá hmotnosti v hmotnosti, pokud není uvedeno jinak. V lékopisu je tento výraz nahrazen podle potřeby údaji μg/g nebo μg/ml, pokud není uvedeno jinak.

Procenta hmotnostně objemová a procenta objemově hmotnostní nejsou v Ph. Eur. ani v ČL povolena. Potřebné koncetrace se vyjadřují za použití příslušných jednotek, obvykle jako g/l nebo ml/kg.

Teplota

Kde analytický postup uvádí teplotu bez číselných hodnot, mají obecně používané výrazy následující význam:

v mrazicím boxu	pod -15 °C
v chladničce	2 °C až 8 °C
za chladu nebo v chladnu	8 °C až 15 °C
při pokojové teplotě	15 °C až 25 °C

Obecné stati

Materiály používané pro obaly jsou popsány ve stati Obaly a obalový materiál (*3*). Obecné názvy používané pro materiály, obzvláště plasty, pokrývají skupinu výrobků lišící se nejen ve vlastnostech základní složky, ale také v použitých přísadách. Zkušební metody a limity pro materiály závisí na jejich složení a jsou závazné pouze pro materiály, jejichž složení je definováno v úvodu ke specifikacím. Použití materiálů s jiným složením a zkušební metody a limity pro ně požadované jsou předmětem souhlasu oprávněné autority.

Specifikace pro obaly ve stati Obaly a obalový materiál (*3*) byly vypracovány k obecnému použití pro obaly stanovené kategorie, ale vzhledem k velké rozmanitosti dostupných obalů a možnému novému vývoji uveřejnění specifikace nevylučuje ve zdůvodněných případech použití obalů, které odpovídají specifikacím schváleným oprávněnou autoritou.

V lékopisných článcích se může odkazovat na specifikace obalů uvedené v této části. Obecné články pro lékové formy mohou v části Výroba vyžadovat použití určitých druhů obalů; některé jiné články mohou v části Uchovávání uvést druh obalu, který je doporučen pro dané použití.

Lékopisné články

Lékopisné články (dále články) se člení na části: záhlaví článků, výroba, vlastnosti, zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu, stanovení obsahu (účinnosti), uchovávání, označování a nečistoty. Podle svého charakteru článek nemusí nutně obsahovat všechny části.

Záhlaví článku

Obsahuje názvy, včetně příslušného označení, zda se jedná o omamnou nebo psychotropní látku, venenum nebo separandum, zda jde o článek přeložený z Ph. Eur. nebo o české specifikum. Dále obsahuje vše, co látku jednoznačně charakterizuje, tj. sumární vzorec, podle potřeby strukturní vzorec, relativní molekulovou (atomovou) hmotnost, číslo CAS a definici látky s rozmezím jejího obsahu. Vzorce, relativní molekulová (atomová) hmotnost a číslo CAS, viz dále, nejsou součástí analytického hodnocení článku.

Názvy. Články ČL jsou uvedeny mezinárodními názvy schválenými nebo doporučenými Světovou zdravotnickou organizací, pod kterými jsou názvy české. Podle potřeby jsou uvedena též synonyma (obvykle název ČSL 4 nebo Ph. Eur, pokud je rozdílný).

Vzorce. Jsou uvedeny sumární vzorce a dle potřeby též strukturní vzorce, které se formou liší od vzorců Ph. Eur. tak, aby vyhovovaly národním zvyklostem.

Relativní atomové a molekulové hmotnosti. Relativní molekulová hmotnost (M_r) látky, popř. relativní atomová hmotnost (A_r) látky se uvádí tam, kde je to vhodné. M_r jsou vypočítány z tabulky relativních atomových hmotností a zaokrouhleny na dvě desetinná místa.

Číslo CAS (Chemical Abstracts Service). V ČL jsou tato čísla uvedena i pro léčivé a pomocné látky (Ph. Eur. čísla CAS uvádí pouze u zkoumadel).

Definici v ČL tvoří odstavec definující léčivo, pomocnou látku, prostředek nebo obal. U chemických látek patří do definice český chemický název vytvořený podle zásad IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) a zásad českého názvosloví anorganické a organické chemie[1)], bez ohledu na Pravidla českého pravopisu.

Rozmezí obsahu. Kde je předepsáno rozmezí obsahu, je to rozmezí stanovené v návaznosti na metodu stanovení obsahu (účinnosti) zkoušené látky.

Rostlinné drogy. V článcích na rostlinné drogy se v záhlaví článku uvádí, je-li předmětem článku např. celá droga nebo práškovaná droga. Pokud se článek týká celé i práškované drogy, záhlaví článku to jasně udává.

[1)] Bláha, K., Ferles, M., Staněk, J. a kol.: Nomenklatura organické chemie. 3., rozšířené a upravené vydání. Praha, Academia 1985.
Klikorka, J., Hanzlík, J.: Názvosloví anorganické chemie. Praha, Academia 1987.

Výroba

Ustanovení odstavce Výroba upozorňují na určité aspekty výrobního postupu. Tvoří rámcové pokyny pro výrobce. Mohou se týkat např. zdroje materiálů, vlastního výrobního postupu a jeho validace a kontroly, průběžných provozních kontrol nebo zkoušení, které má být prováděno výrobcem u konečného výrobku, buď u vybraných šarží, nebo u každé šarže před propuštěním. Tato ustanovení nelze vždy ověřit na vzorku konečného výrobku nezávislým analytikem. Oprávněná autorita může ověřit dodržování těchto pokynů např. prozkoumáním údajů získaných od výrobce, inspekcí nebo zkoušením vhodných vzorků.

Nepřítomnost části Výroba neznamená, že nemá být věnována pozornost tomu, co bylo uvedeno výše. Výrobek popsaný v článku se vyrábí ve shodě se zásadami správné výrobní praxe a v souladu s příslušnými mezinárodními dohodami a nadnárodními a národními předpisy, kterými se řídí přípravky pro humánní a veterinární použití.

Tam, kde článek pro vakcínu v části Výroba definuje vlastnosti vakcinačního kmene, jakékoli zkušební metody uváděné pro potvrzení těchto vlastností jsou určeny k informaci jako příklady vhodných metod.

Vlastnosti

Ustanovení v části Vlastnosti jsou informativní a nejsou lékopisnými požadavky.

Rozpustnost. V ustanoveních týkajících se rozpustnosti v části Vlastnosti mají použité výrazy vztažené na teplotu 15 °C až 25 °C následující význam:

Tab. 1.2-1

Popisný výraz	Přibližný objem rozpouštědla v mililitrech na gram rozpuštěné látky
velmi snadno rozpustný	méně než 1
snadno rozpustný	1 až 10
dobře rozpustný	10 až 30
mírně rozpustný	30 až 100
těžce rozpustný	100 až 1000
velmi těžce rozpustný	1000 až 10 000
prakticky nerozpustný	více než 10 000

Termín "částečně rozpustný" se používá k popisu směsi, kde se rozpustí jen některé ze složek. Termín "mísitelný" se používá k popisu kapaliny, která je mísitelná v každém poměru s uvedeným rozpouštědlem.

Zkoušky totožnosti

Zkoušky uvedené v části Zkoušky totožnosti jsou určeny k tomu, aby s přijatelným stupněm jistoty potvrdily, že výrobek odpovídá označení na obalu.

Některé články mají další členění označené *"Základní sestava zkoušek"* a *"Alternativní sestava zkoušek"*. Zkouška nebo zkoušky tvořící "Alternativní sestavu zkoušek" mohou být použity namísto "Základní sestavy zkoušek" za předpokladu, že se může prokázat, že látku nebo přípravek lze zcela vysledovat k ověřené šarži, která byla kompletně přezkoušena dle lékopisného článku a vyhovuje všem jeho požadavkům.

Zkoušky na čistotu a stanovení obsahu nebo účinnosti

Rozsah. Požadavky nejsou koncipovány tak, aby braly v úvahu všechny možné nečistoty. Není možné např. předpokládat, že lze tolerovat nějakou nečistotu, která není zjistitelná pomocí předepsaných zkoušek, jestliže zkušenost a správná farmaceutická praxe požadují, aby byla nepřítomna. Viz též dále uvedenou část označenou Nečistoty.

Výpočty. Jestliže se vyžaduje, aby výsledek zkoušky byl počítán na vysušenou nebo bezvodou látku nebo na jiný požadavek, provede se stanovení ztráty sušením, obsahu vody nebo jiné vlastnosti metodou předepsanou v příslušné zkoušce článku.

Rozmezí. Předepsaná rozmezí jsou založena na údajích získaných v běžné analytické praxi; počítají s běžnými analytickými chybami, s přijatelnými změnami ve výrobě a ve složení a se znehodnocením v rozsahu považovaném za přijatelný. Nelze tolerovat změny předepsaného rozmezí, aby se zjistilo, zda zkoušený výrobek vyhovuje požadavkům příslušného článku.

Při zjišťování shody s číselným údajem se vypočítaný výsledek zkoušky na čistotu nebo stanovení nejdříve zaokrouhlí na počet udaných číslic, pokud není předepsáno jinak. Poslední číslice se zvyšuje o jednu, když je zaokrouhlená část rovna nebo vyšší než polovina jednotky, zatímco se nemění, když je zaokrouhlená část menší než polovina jednotky.

Uvádění povoleného limitu nečistot. Přibližný rozsah tolerované nečistoty nebo součtu nečistot může být uváděn v závorce pouze pro informaci. Není-li předepsáno použití referenční látky pro označenou nečistotu, může být její obsah vyjádřen jako jmenovitá koncentrace látky použité pro přípravu porovnávacího roztoku předepsaného v článku, není-li uvedeno jinak. Kladné či záporné posouzení obsahu nečistot se určí podle shody nebo neshody s udanou zkouškou.

Rostlinné drogy. Pro rostlinné drogy se síranový popel, celkový popel, ve vodě rozpustná látka, v lihu 96% rozpustná látka, obsah vody, obsah silice a obsah účinné látky počítají s odkazem na látku, která nebyla zvlášť vysušena, pokud není v článku předepsáno jinak.

Ekvivalenty. V případě uvedení ekvivalentu látky se pro lékopisné účely použijí uvedená čísla, pokud mají platit požadavky určitého článku.

Biologické zkoušky. Při použití zvířat ke stanovení účinnosti a k jiným biologickým zkouškám je nutno dodržovat zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

Uchovávání

Informace a doporučení uvedená v části Uchovávání nejsou zcela závazná. Oprávněná autorita může předepsat zvláštní podmínky uchovávání, které se mají dodržovat. Český lékopis předepisuje navíc proti Ph. Eur zvláštní podmínky uchovávání pro následující skupiny léčiv: omamné látky, psychotropní látky, venena a separanda, viz tabulky I až III. V uvedeném pořadí platí nadřazenost jejich uchovávání. Tato nadřazenost byla použita i při sestavení uvedených tabulek. Pokud je látka separandem i omamnou látkou, je uvedena pouze v tabulce I. Výrobky popsané v lékopisu se uchovávají tak, aby se zabránilo jejich znečištění a pokud možno i jejich znehodnocení. Kde jsou doporučeny speciální podmínky uchovávání, včetně druhu obalu, viz také *3.2*, a teploty uchovávání, jsou uvedeny v článku.

V článcích v části označené Uchovávání se používají následující výrazy s uvedeným významem. *Chráněn před vlhkem* znamená, že výrobek je uchováván ve vzduchotěsném obalu. Ve vlhké atmosféře je třeba obal otvírat opatrně. Nízkého obsahu vlhkosti se může docílit, je-li to nutné, použitím vysoušedla v obalu za podmínky, že nedojde k přímému dotyku vysoušedla s výrobkem.

Chráněn před světlem znamená, že výrobek citlivý na světlo se uchovává buď v obalu z materiálu, který dostatečně absorbuje aktinické světlo a tím chrání obsah před změnou jím způsobenou, nebo v obalu vloženém do vnějšího obalu, který rovněž poskytuje takovou ochranu, nebo se uchovává na takovém místě, které je před světlem zcela chráněno.

Označování

Označování je obvykle předmětem nadnárodních a národních předpisů a mezinárodních dohod. Ustanovení uvedená v části Označování nejsou úplná a navíc jsou pro lékopisné účely závazná pouze ta ustanovení, která jsou nutná k důkazu souhlasu nebo nesouhlasu s článkem. Jakákoliv další ustanovení týkající se označování jsou zařazena v lékopisu jako doporučení. Lékopisná ustanovení týkající se označování se mohou uvést na vnitřním nebo vnějším obalu nebo v příbalové informaci, podle rozhodnutí oprávněné autority.

Varování

Materiály popsané v článcích a zkoumadla určená pro použití v lékopisu mohou být škodlivé zdraví, pokud se nedodržují odpovídající bezpečnostní opatření. Zásady správné praxe v kontrolní laboratoři a ustanovení souvisejících předpisů je třeba neustále zachovávat. Na látky obzvláště nebezpečné je upozorňováno v určitých článcích pomocí varovných oznámení; nepřítomnost takových oznámení neznamená, že nebezpečí neexistuje.

Nečistoty

Seznam všech známých a možných nečistot, které mají být kontrolovány zkouškami v určitém článku, může být uveden pro informaci v části Nečistoty. Seznam může být rozdělen na dvě části: "kvalifikované nečistoty" a "jiné detegovatelné nečistoty". Kvalifikované nečistoty jsou takové nečistoty, které byly jako takové přijaty předem oprávněnou autoritou; mohou být též zahrnuty nečistoty považované za kvalifikované jinými způsoby (např. nečistoty vyskytující se jako přirozené metabolity). Jiné detegovatelné nečistoty jsou takové možné nečistoty, které nebyly zjištěny v žádném vzorku látky během vypracování článku nebo které se vyskytují v množstvích nižších než 0,1 %, ale jež jsou limitovány zkouškami na čistotu.

Kritické fyzikální vlastnosti

Seznam kritických fyzikálních vlastností, které nejsou předmětem oficiálních požadavků, ale jež jsou přesto důležité pro použití nějaké látky, může být připojen k článku pro informaci, viz též Obecná ustanovení uvedená výše.

Referenční látky, referenční přípravky a referenční spektra

Některé články předepisují použití referenční látky, referenčního přípravku nebo referenčního spektra. Tyto jsou připraveny s ohledem na jejich zamýšlené použití, jak je předepsáno v článcích, a nemusejí být vhodné za jiných okolností. Český lékopis předepisuje referenční materiály jednak připravené Evropskou lékopisnou komisí pro články přeložené z Ph. Eur. a jednak referenční materiály připravené Lékopisnou komisí MZ ČR pro články představující česká specifika. Komise neberou odpovědnost za jakékoliv chyby vznikající z jiného použití, než je u referenčních materiálů předepsáno.

Referenční látky, referenční přípravky a referenční spektra pro zkoušení podle článků přeložených z Ph. Eur. lze objednat v Technickém sekretariátu Evropské lékopisné komise. Jsou to oficiální referenční materiály, které mají být použity v případě arbitráže. Seznam referenčních látek, referenčních přípravků a referenčních spekter lze získat v technickém sekretariátu. Seznam referenčních materiálů určených pro zkoušení podle článků představujících česká specifika se uveřejňuje ve Věstníku Státního ústavu pro kontrolu léčiv v Praze a referenční materiály lze objednat v sekretariátu Lékopisné komise MZ ČR.

Pro rutinní analýzy látek podle článků přeložených z Ph. Eur. se mohou použít pracovní standardy za předpokladu, že jsou navázány na referenční materiály Evropské lékopisné komise.

Každá informace nezbytná pro správné použití referenčních materiálů Ph. Eur. je uvedena v označení na obalu, v příbalové informaci nebo v katalogu. Tam, kde nejsou uvedeny podmínky sušení v příbalové informaci nebo na obalu, má se látka použít tak, jak byla dodána. Evropská lékopisná komise neposkytuje analytické certifikáty nebo další údaje, které se nevztahují k předepsanému použití výrobku. Datum použitelnosti se neuvádí; je zaručeno, že referenční materiály lze používat od data jejich obdržení po dobu nejméně 6 měsíců, jestliže jsou uchovávány tak, jak je popsáno v příbalové informaci; o jejich použití po této době je nutné se informovat v Technickém sekretariátu Evropské lékopisné komise. Nelze ručit za stabilitu obsahu otevřených balení.

Chemické referenční látky. Zkratka CRL (v Ph. Eur. CRS) označuje chemickou referenční látku vyhlášenou Evropskou lékopisnou komisí nebo referenční látku vyhlášenou Lékopisnou komisí MZ ČR. Některé chemické referenční látky se používají pro mikrobiologické stanovení antibiotik a jejich účinnost se udává v mezinárodních jednotkách m.j. (v Ph. Eur. označené U.I.) v příbalové informaci nebo na obalu a jsou definovány stejným způsobem jako biologické referenční přípravky.

Biologické referenční přípravky. Většinu primárních referenčních přípravků citovaných v Ph. Eur. i v ČL tvoří mezinárodní standardy a mezinárodní referenční přípravky vyhlašované Světovou zdravotnickou organizací. Protože tyto referenční materiály jsou obvykle k dispozici pouze v omezených množstvích, Evropská lékopisná komise vyhlašuje biologické referenční přípravky (uvedené zkratkou BRP), kde je to vhodné. Účinnost biologických referenčních přípravků se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách značených m.j. (v Ph. Eur. označené U.I.). Pro některé biologické referenční přípravky, kde neexistuje mezinárodní standard nebo mezinárodní referenční přípravek, se účinnost vyjadřuje v jednotkách Evropského lékopisu Ph.Eur.j. (v Ph. Eur. označené jako Ph.Eur.U.).

Pokud ČL obsahuje článek, u něhož je třeba ke zkoušení biologický referenční přípravek, který nebyl připraven Evropskou lékopisnou komisí, zajistí přípravu takového biologického referenčního přípravku Lékopisná komise MZ ČR v návaznosti na příslušný referenční přípravek Světové zdravotnické organizace.

Referenční látky pro radiofarmaka jsou látky s definovanou čistotou, jsou vždy opatřeny příslušným osvědčením s uvedením jakosti a doby použitelnosti. Získávají se od Českého metrologického institutu - Inspektorátu pro ionizující záření, Radiová 1, Praha 10.

Referenční spektra. Referenční spektrum (pro infračervenou spektrofotometrii) je doprovázeno informací týkající se podmínek použitých při přípravě látky ke zkoušení a záznamu spektra. Referenční spektra potřebná ke zkoušení podle článků přeložených z Ph. Eur. lze objednat v Technickém sekretariátu Evropské lékopisné komise. Referenční spektra potřebná ke zkoušení podle článků představujících česká specifika lze objednat v sekretariátu Lékopisné komise MZ ČR.

1.3 Značky a symboly

A	absorbance
$A_{1cm}^{1\%}$	specifická absorbance
A_r	relativní atomová hmotnost
$[\alpha]_D^{20}$	specifická optická otáčivost
BRP	biologický referenční přípravek
CRL	chemická referenční látka
d_{20}^{20}	relativní hustota
λ	vlnová délka
m.j.	mezinárodní jednotka
M_r	relativní molekulová hmotnost
n_D^{20}	index lomu
Ph.Eur.j.	Ph. Eur. jednotka
R	zkoumadlo
R_F	retenční faktor používaný v chromatografii vyjadřující poměr vzdálenosti středu skvrny zkoušené látky ke vzdálenosti čela mobilní fáze, měřeno od místa nanášení
RS	roztok zkoumadla
R_{st}	poměr vzdálenosti středu skvrny zkoušené látky od místa nanášení ke vzdálenosti středu skvrny porovnávací látky od místa nanášení používaný v chromatografii
TT	teplota tání
TV	teplota varu
VR	základní látka pro odměrnou analýzu
VS	odměrný roztok

Zkratky používané v článcích na imunní séra, imunoglobuliny a vakcíny

$CCID_{50}$	Statisticky stanovené množství viru, u něhož lze předpokládat, že infikuje 50 % buněčných kultur, do nichž bylo přidáno.
ED_{50}	Statisticky stanovená dávka vakcíny, u níž lze v podmínkách zkoušek předpokládat, že u 50 % zvířat navodí tvorbu protilátek na antigeny související s vakcínou.
EID_{50}	Statisticky stanovené množství viru, u něhož lze předpokládat, že infikuje 50 % ptačích embryí, do nichž bylo inokulováno.
ID_{50}	Statisticky stanovené množství viru, u něhož lze předpokládat, že infikuje 50 % zvířat, jimž bylo inokulováno.

L+/10 dávka	Nejmenší množství toxinu, které v podmínkách zkoušky smícháno s 0,1 m.j. antitoxinu a podáno specifikovaným způsobem usmrtí v daném období pokusná zvířata.
L+ dávka	Nejmenší množství toxinu, které v podmínkách zkoušky smícháno s 1 m.j. antitoxinu a podáno specifikovaným způsobem usmrtí pokusná zvířata.
LD_{50}	Statisticky stanovené množství látky, u něhož po podání specifikovaným způsobem lze předpokládat, že v daném období usmrtí 50 % pokusných zvířat.
Lf dávka	Množství toxinu nebo toxoidu, které v nejkratším období vyvločkuje s 1 m.j. antitoxinu.
Lo/10 dávka	Největší množství toxinu, které v podmínkách zkoušky smícháno s 0,1 m.j. antitoxinu a podáno specifikovanýmn způsobem nezpůsobí v daném období pokusným zvířatům toxické příznaky.
Lp/10 dávka	Nejmenší množství toxinu, které v podmínkách zkoušky smícháno s 0,1 m.j. antitoxinu a podáno specifikovaným způsobem paralyzuje v daném období pokusná zvířata.
Lr/100 dávka	Nejmenší množství toxinu, které v podmínkách zkoušky smícháno s 0,01 m.j. antitoxinu a intrakutánně vstříknuto způsobí v daném období charakteristickou reakci v místě podání.
MLD	nejmenší smrtná dávka
PD_{50}	Statisticky stanovená dávka vakcíny, u níž lze v podmínkách zkoušek předpokládat, že ochrání 50 % zvířat před čelenžní dávkou toxinů nebo mikroorganismů, proti nimž je účinná.
PFU	jednotky vytvářející poky nebo jednotky vytvářející plaky
SPF	prostý specifikovaných patogenů

Sbírky mikroorganismů

ATCC	American Type Culture Collection 12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852, USA
C.I.P.	Collection de Bactéries de l'Institut Pasteur B.P.52, 25 Rue du Dr Roux 75724 Paris Cedex 15, France
I.P.	Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) Institut Pasteur 25 Rue du Dr Roux 75724 Paris Cedex, France
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. 23 St Machar Drive Aberdeen AB2 1RY, Great Britain

NCPF	National Collection of Pathogenic Fungi London School of Hygiene and Tropical Medicine Keppel Street London WC1E 7HT, Great Britain
NCTC	National Collection of Type Cultures Central Public Health Laboratory Colindale Avenue London NW9 5HT, Great Britain
NCYC	National Collection of Yeast Cultures AFRC Food Research Institute Colney Lane Norwich NR4 7UA, Great Britain
S.S.I.	Statens Serum Institut 80 Amager Boulevard, Copenhagen, Denmark
CCM	Česká sbírka mikroorganismů Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Tvrdého 14, 602 00 Brno
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur mikroorganismů Státní zdravotní ústav Centrum epidemiologie a mikrobiologie Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

1.4 Jednotky mezinárodní soustavy (SI) použité v lékopise a vztah k jiným jednotkám

Mezinárodní systém jednotek (SI)

Mezinárodní systém jednotek zahrnuje tři skupiny: základní jednotky, odvozené jednotky a doplňkové jednotky[1]. Základní jednotky a jejich definice obsahuje tabulka 1.4-1.

Odvozené jednotky se mohou tvořit kombinací základních jednotek podle algebraických vztahů mezi odpovídajícími veličinami. Některé z těchto odvozených jednotek mají speciální názvy a symboly. SI jednotky použité v Ph. Eur. jsou uvedeny v tabulce 1.4-2.

Některé důležité, všeobecně používané vedlejší jednotky uvádí tabulka 1.4-3.

Předpony uvedené v tabulce 1.4-4 se používají při vytváření názvů a symbolů dekadických násobků a dílů jednotek SI.

Tab. 1.4-1 Základní jednotky SI

Veličina		Jednotka		Definice
Název	Symbol	Název	Symbol	
délka	*l*	metr	m	Metr je délka dráhy, kterou proběhne světlo ve vakuu za 1/299 792 458 sekundy.
hmotnost	*m*	kilogram	kg	Kilogram je hmotnost mezinárodního prototypu kilogramu, uloženého v Mezinárodním úřadě pro váhy a míry v Sévres.
čas	*t*	sekunda	s	Sekunda je trvání 9 192 631 770 period záření odpovídajícího přechodu mezi dvěma velmi jemnými hladinami základního stavu atomu cesia 133.
elektrický proud	*I*	ampér	A	Ampér je stálý elektrický proud, který při průtoku dvěma rovnoběžnými přímými a nekonečně dlouhými vodiči zanedbatelného kruhového průřezu, umístěnými ve vakuu ve vzájemné vzdálenosti 1 metru vyvolá mezi nimi stálou sílu $2 \cdot 10^{-7}$ newtonu na metr délky.
termodynamická teplota	*T*	kelvin	K	Kelvin je 1/273,16 termodynamické teploty trojného bodu vody.
látkové množství	*n*	mol	mol	Mol je látkové množství soustavy, která obsahuje právě tolik elementárních jedinců (entit), kolik je atomů v 0,012 kg uhlíku 12*
svítivost	I_v	kandela	cd	Kandela je svítivost zdroje, který v daném směru vysílá monochromatické záření o kmitočtu $540 \cdot 10^{12}$ hertzů a jehož zářivost v tomto směru je 1/683 wattu na steradián.

* Při udávání látkového množství je třeba specifikovat elementární entity; mohou jimi být atomy, molekuly, ionty, elektrony, jiné částice nebo blíže určená seskupení částic.

[1] Definice jednotek užívaných v Mezinárodním systému jsou uvedeny v knize "Le Système International d'Unités (SI)", vydané Bureau International des Poids et Mesures, Pavillon de Breteuil, F-92310, Sevres. V České republice jsou veličiny, jednotky, značky a převodní činitele systému mezinárodních jednotek SI vydávány a doplňovány Českým normalizačním institutem v normách řady ČSN ISO 31.

Tab. 1.4-2 Jednotky použité v lékopise a odpovídající jiným jednotkám

Veličina		Jednotka				Převod jiných jednotek na jednotky SI
Název	Symbol	Název	Symbol	Základní jednotka SI	Jiné jednotky SI	
vlnočet	$\tilde{\nu}$	reciproký metr	1/m	m^{-1}		
vlnová délka	λ	mikrometr nanometr	μm nm	10^{-6} m 10^{-9} m		
plošný obsah	*A, S*	čtverečný metr	m^2	m^2		
objem	*V*	krychlový metr	m^3	m^3		1 ml = 1 cm^3 = = 10^{-6} m^3
kmitočet	*f, ν*	hertz	Hz	s^{-1}		
hustota	ρ	kilogram na krychlový metr	kg/m^3	$kg.m^{-3}$		1 g/ml = 1 g/cm^3 = = 10^3 $kg.m^{-3}$
rychlost	*v*	metr za sekundu	m/s	$m.s^{-1}$		
síla	*F*	newton	N	$m.kg.s^{-2}$		1 dyn = 1 $g.cm.s^{-2}$ = = 10^{-5} N 1 kp = 9,80665 N
tlak, mechanické napětí	*p*	pascal	Pa	$m^{-1}.kg.s^{-2}$	$N.m^{-2}$	1 dyn/cm^2 = 10^{-1} Pa = = 10^{-1} $N.m^{-2}$ 1 atm = 101325 Pa = = 101,325 kPa 1 bar = 10^5 Pa = = 0,1 MPa 1 mm Hg = = 133,322387 Pa 1 Torr = = 133,322368 Pa 1 psi = 6,894757 kPa
dynamická viskozita	η	pascalsekunda	Pa.s	$m^{-1}.kg.s^{-1}$	$N.s.m^{-2}$	1 P = 10^{-1} Pa.s = = 10^{-1} $N.s.m^{-2}$ 1 cP = 1 mPa.s
kinematická viskozita	*ν*	čtverečný metr za sekundu	m^2/s	$m^2.s^{-1}$	$Pa.s.m^3.kg^{-1}$ $N.m.s.kg^{-1}$	1 St = 1 $cm^2.s^{-1}$ = = 10^{-4} $m^2.s^{-1}$
energie	*E, W*	joule	J	$m^2.kg.s^{-2}$	N.m	1 erg = 1 $cm^2.g.s^{-2}$ = = 1 dyn.cm = 10^{-7} J 1 cal = 4,1868 J
výkon (tepelný tok)	*P*	watt	W	$m^2.kg.s^{-3}$	$N.m.s^{-1}$ $J.s^{-1}$	1 erg/s = = 1 $dyn.cm.s^{-1}$ = = 10^{-7}W = = 10^{-7} $N.m.s^{-1}$ = = 10^{-7} $J.s^{-1}$
pohlcená dávka (radiační energie)	*D*	gray	Gy	$m^2.s^{-2}$	$J.kg^{-1}$	1 rad = 10^{-2} Gy
elektrické napětí, elektromotorické napětí	*U*	volt	V	$m^2.kg.s^{-3}.A^{-1}$	$W.A^{-1}$	

Veličina		Jednotka				Převod jiných jednotek na jednotky SI
Název	Symbol	Název	Symbol	Základní jednotka SI	Jiné jednotky SI	
elektrický odpor	R	ohm	Ω	$m^2.kg.s^{-3}.A^{-2}$	$V.A^{-1}$	
elektrický náboj	Q	coulomb	C	A.s		
aktivita nuklidu	A	becquerel	Bq	s^{-1}		1 Ci = 37.10^9 Bq = = 37.10^9 s^{-1}
látková koncen-trace, molární koncentrace	c	mol na krych-lový metr	mol/m^3	$mol.m^{-3}$		1 mol/l = 1 M = = 1 mol/dm^3 = = 10^3 $mol.m^{-3}$
hmotnostní koncentrace	p, ρ	kilogram na krychlový metr	kg/m^3	$kg.m^{-3}$		1 g/l = 1 g/dm^3 = = 1 $kg.m^{-3}$

Tab. 1.4-3 Vedlejší jednotky

Veličina	Jednotka		Hodnoty v SI jednotkách
	Název	Symbol	
čas	minuta hodina den	min h d	1 min = 60 s 1 h = 60 min = 3600 s 1 d = 24 h = 86400 s
rovinný úhel	stupeň	°	1° = (π/180) rad
objem	litr	l	1 l = 1 dm^3 = 10^{-3} m^3
hmotnost	tuna	t	1 t = 10^3 kg
frekvence otáčení	otáčka za minutu	ot/min	1 ot/min = (1/60) s^{-1}

Tab. 1.4-4 Dekadické násobky a díly jednotek

Činitel	Předpona	Značka	Činitel	Předpona	Značka
10^{18}	exa	E	10^{-1}	deci	d
10^{15}	peta	P	10^{-2}	centi	c
10^{12}	tera	T	10^{-3}	mili	m
10^9	giga	G	10^{-6}	mikro	μ
10^6	mega	M	10^{-9}	nano	n
10^3	kilo	k	10^{-12}	piko	p
10^2	hekto	h	10^{-15}	femto	f
10^1	deka	da	10^{-18}	atto	a

Poznámky

1. V lékopise se používá Celsiova stupnice teplot (symbol je *t*). Je definována vztahem:

$$t = T - T_o ,$$

v němž T_o je definována jako 273,15 K. Celsiova nebo stostupňová stupnice se vyjadřuje ve stupních Celsia (symbol °C). Jednotka "stupeň Celsia" se rovná jednotce "kelvin".

2. Výrazy pro koncentrace používané v lékopise jsou definovány v Obecných zásadách.

3. Radián je rovinný úhel mezi dvěma poloměry kružnice, které na obvodě vytínají oblouk stejné délky, jakou má poloměr.

4. V lékopise jsou definovány podmínky odstřeďování porovnáním zrychlení a normálního tíhového zrychlení (g_n):

$$g_n = 9{,}806\,65 \text{ m.s}^{-2} .$$

5. V lékopise jsou použity některé veličiny bez rozměrů: relativní hustota (*2.2.5*), absorbance (*2.2.25*), specifická absorbance (*2.2.25*) a index lomu (*2.2.6*), stejně jako veličiny vyjádřené v jiných jednotkách, jako specifická optická otáčivost (*2.2.7*).

6. Mikrokatal je definovaný jako enzymová účinnost, která za definovaných podmínek přemění (např. hydrolýzou) 1 mikromol substrátu za sekundu.

7. Energie částic a elektromagnetického záření se vyjadřuje v joulech (J) a popř. v pokusně získaných elektronvoltech (eV):

$$1 \text{ eV} = 1{,}602\,177 \,.\, 10^{-19} \text{ J} .$$

Tabulka relativních atomových hmotností

N

Následující tabulka byla připravena Komisí pro atomové hmotnosti a zastoupení izotopů (Commission on Atomic Weights and Isotopic Abundances) a publikována[1)] v roce 1996 Mezinárodní unií pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC). Podklady k uveřejnění tabulky v lékopise připravilo Národní centrum IUPAC pro Českou republiku.

Název latinský (český)	Symbol	Atomové číslo	Relativní atomová hmotnost
Actinium (aktinium)	Ac	89	[227]
Aluminium (hliník)	Al	13	26,981538(2)
Americium (americium)	Am	95	[243]
Argentum (stříbro)	Ag	47	107,8682(1)
Argon (argon)	Ar	18	39,948(1)
Arsenum (arsen)	As	33	74,92160(2)
Astatium (astat)	At	85	[210]
Aurum (zlato)	Au	79	196,96654(3)
Barium (baryum)	Ba	56	137,327(7)
Berkelium (berkelium)	Bk	97	[247]
Beryllium (beryllium)	Be	4	9,012182(3)
Bismuthum (bismut)	Bi	83	208,98038(2)
Borum (bor)	B	5	10,811(7)
Bromum (brom)	Br	35	79,904(1)
Cadmium (kadmium)	Cd	48	112,411(8)
Caesium (cesium)	Cs	55	132,90545(2)
Calcium (vápník)	Ca	20	40,078(4)
Californium (kalifornium)	Cf	98	[251]
Carboneum (uhlík)	C	6	12,0107(8)
Cerium (cer)	Ce	58	140,116(1)
Chlorum (chlor)	Cl	17	35,4527(9)
Chromium (chrom)	Cr	24	51,9961(6)
Cobaltum (kobalt)	Co	27	58,933200(9)
Cuprum (měď)	Cu	29	63,546(3)
Curium (curium)	Cm	96	[247]

[1)] Pure Appl. Chem., 68, 1996, 2339-2359.

Název latinský (český)	Symbol	Atomové číslo	Relativní atomová hmotnost
Dysprosium (dysprosium)	Dy	66	162,50(3)
Einsteinium (einsteinium)	Es	99	[252]
Erbium (erbium)	Er	68	167,26(3)
Europium (europium)	Eu	63	151,964(1)
Fermium (fermium)	Fm	100	[257]
Ferrum (železo)	Fe	26	55,845(2)
Fluorum (fluor)	F	9	18,9984032(5)
Francium (francium)	Fr	87	[223]
Gadolinium (gadolinium)	Gd	64	157,25(3)
Gallium (gallium)	Ga	31	69,723(1)
Germanium (germanium)	Ge	32	72,61(2)
Hafnium (hafnium)	Hf	72	178,49(2)
Helium (helium)	He	2	4,002602(2)
Holmium (holmium)	Ho	67	164,93032(2)
Hydrargyrum (rtuť)	Hg	80	200,59(2)
Hydrogenium (vodík)	H	1	1,00794(7)
Indium (indium)	In	49	114,818(3)
Iodium (jod)	I	53	126,90447(3)
Iridium (iridium)	Ir	77	192,217(3)
Kalium (draslík)	K	19	39,0983(1)
Krypton (krypton)	Kr	36	83,80(1)
Lanthanum (lanthan)	La	57	138,9055(2)
Lawrentium (lawrencium)	Lr	103	[262]
Lithium (lithium)	Li	3	6,941(2)
Lutetium (lutecium)	Lu	71	174,967(1)
Magnesium (hořčík)	Mg	12	24,3050(6)
Manganum (mangan)	Mn	25	54,938049(9)
Mendelevium (mendelevium)	Md	101	[258]
Molybdaenum (molybden)	Mo	42	95,94(1)
Natrium (sodík)	Na	11	22,989770(2)
Neodymium (neodym)	Nd	60	144,24(3)
Neon (neon)	Ne	10	20,1797(6)
Neptunium (neptunium)	Np	93	[237]
Niccolum (nikl)	Ni	28	58,6934(2)

Název latinský (český)	Symbol	Atomové číslo	Relativní atomová hmotnost
Niobium (niob)	Nb	41	92,90638(2)
Nitrogenium (dusík)	N	7	14,00674(7)
Nobelium (nobelium)	No	102	[259]
Osmium (osmium)	Os	76	190,23(3)
Oxygenium (kyslík)	O	8	15,9994(3)
Palladium (palladium)	Pd	46	106,42(1)
Phosphorus (fosfor)	P	15	30,973761(2)
Platinum (platina)	Pt	78	195,078(2)
Plumbum (olovo)	Pb	82	207,2(1)
Plutonium (plutonium)	Pu	94	[244]
Polonium (polonium)	Po	84	[209]
Praseodymium (praseodym)	Pr	59	140,90765(2)
Promethium (promethium)	Pm	61	[145]
Protactinium (protaktinium)	Pa	91	231,03588(2)
Radium (radium)	Ra	88	[226]
Radon (radon)	Rn	86	[222]
Rhenium (rhenium)	Re	75	186,207(1)
Rhodium (rhodium)	Rh	45	102,90550(2)
Rubidium (rubidium)	Rb	37	85,4678(3)
Ruthenium (ruthenium)	Ru	44	101,07(2)
Samarium (samarium)	Sm	62	150,36(3)
Scandium (skandium)	Sc	21	44,955910(8)
Selenium (selen)	Se	34	78,96(3)
Silicium (křemík)	Si	14	28,0855(3)
Stannum (cín)	Sn	50	118,710(7)
Stibium (antimon)	Sb	51	121,760(3)
Strontium (stroncium)	Sr	38	87,62(1)
Sulfur (síra)	S	16	32,066(6)
Tantalum (tantal)	Ta	73	180,9479(1)
Technetium (technecium)	Tc	43	[98]
Tellurium (tellur)	Te	52	127,60(3)
Terbium (terbium)	Tb	65	158,92534(2)
Thallium (thallium)	Tl	81	204,3833(2)
Thorium (thorium)	Th	90	232,0381(1)

Název latinský (český)	Symbol	Atomové číslo	Relativní atomová hmotnost
Thulium (thulium)	Tm	69	168,93421(2)
Titanium (titan)	Ti	22	47,867(1)
Wolframium (wolfram)	W	74	183,84(1)
Uranium (uran)	U	92	238,0289(1)
Vanadium (vanad)	V	23	50,9415(1)
Unnilennium (unnilennium) [Meitnerium]	Une [Mt]	109	[266]
Unnilhexium (unnilhexium) [Seaborgium]	Unh [Sg]	106	[263]
Unniloctium (unniloctium) [Hassium]	Uno [Hs]	108	[265]
Unnilpentium (unnilpentium) [Dubnium]	Unp [Db]	105	[262]
Unnilquadium (unnilquadium) [Rutherfordium]	Unq [Rf]	104	[261]
Unnilseptium (unnilseptium) [Bohrium]	Uns [Bh]	107	[262]
Ununnilium (ununnilium)	Uun	110	[269]
Unununium (unununium)	Uuu	111	[272]
Xenon (xenon)	Xe	54	131,29(2)
Ytterbium (ytterbium)	Yb	70	173,04(3)
Yttrium (yttrium)	Y	39	88,90585(2)
Zincum (zinek)	Zn	30	65,39(2)
Zirconium (zirkonim)	Zr	40	91,224(2)

Poznámka: Hranaté závorky u čísel ve sloupci Relativní atomové hmotnosti značí kolísání hodnoty poslední číslice a kulaté závorky značí kolísání hodnoty čísla uvedeného v závorce.

Názvy a značky uvedené v hranatých závorkách u prvků s atomovým číslem 104, 105, 106, 107, 108, 109 dle doporučení International Union of Pure and Applied Chemistry ze dne 30. 8. 1997.

2 Zkušební metody

2.1 Přístroje a jiné pomůcky ke zkoušení

2.1.1 Kapátka

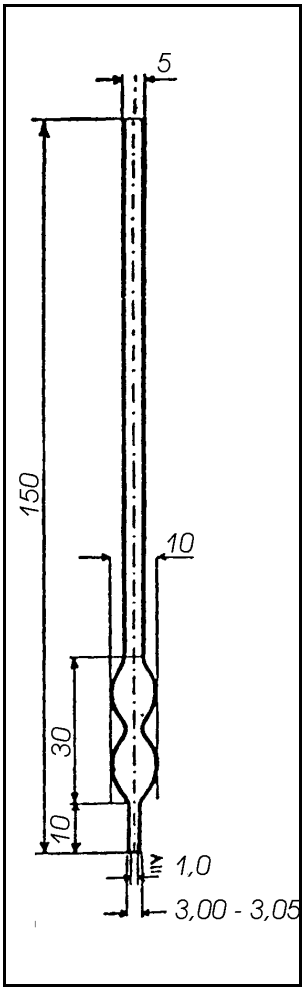
Pokud se používá pojem "kapka", rozumí se tím kapka získaná za použití níže popsaného standardního kapátka.

Standardní kapátko, viz obrázek 2.1.1-1, je vyrobeno z prakticky bezbarvého skla a je na dolním konci zakončeno kruhovým otvorem v rovině kolmé k ose kapátka.

Mohou se použít jiná kapátka, pokud vyhovují následující zkoušce.

Kapátko se pečlivě vyčistí a upevní ve vertikální poloze. 20 kapek *vody R*, které při teplotě (20 ± 1) °C volně vykapou z kapátka konstantní rychlostí 1 kapka/s, váží (1000 ± 50) mg.

S každým kapátkem se provedou tři stanovení. Výsledky jednotlivých stanovení se neliší od průměru ze tří stanovení o více než 5 %.



Obr. 2.1.1-1 Standardní kapátko
Rozměry v milimetrech

2.1.2 Porovnávací tabulka stupňů pórovitosti pro filtry ze slinutého skla[1)]

Tab. 2.1.2-1

Stupeň pórovitosti (Ph. Eur.)*	Maximální průměr pórů v mikrometrech	Německo	Francie	Velká Británie
1,6	méně než 1,6	5f	-	-
-	1 - 2,5	5	-	5
4	1,6 - 4	-	-	-
-	4 - 6	-	5	-
10	4 - 10	4f	-	4
16	10 - 16	4	4	-
40	16 - 40	3	3	3
-	40 - 50	-	-	2
100	40 - 100	2	2	-
-	100 - 120	-	-	1
160	100 - 160	1	1	-
-	150 - 200	0	0	-
250	160 - 250	-	-	-
-	200 - 500	-	00	-

* Evropský lékopis přijal systém, který vyhlásila Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO, přejato do ČSN 70 4850).

Průměry v mikrometrech

Speciální použití

< 2,55 - bakteriologická filtrace
4 až 10 - ultra-jemná filtrace, dělení mikroorganismů velkého průměru
10 až 40 - analytická filtrace, velmi jemná filtrace rtuti, velmi jemná disperze plynů
40 až 100 - jemná filtrace, filtrace rtuti, jemná disperze plynů
100 až 160 - filtrace hrubých materiálů, disperze a promývání plynů, předfiltry při použití jiných filtračních materiálů
160 až 500 - filtrace velmi hrubých materiálů, disperze a promývání plynů

2.1.3 Ultrafialové lampy pro analytické účely

Ultrafialové lampy pro analytické účely se zpravidla skládají ze rtuťové výbojky, která slouží jako zdroj ultrafialového světla, a z vhodného filtru, který eliminuje viditelnou část spektra emitovaného výbojkou.Pokud lékopis předepisuje ve zkoušce použití ultrafialového světla o vlnové délce

[1)] Uváděné hodnoty jsou přibližné.

254 nm nebo 365 nm, použije se lampa, která se skládá ze rtuťové výbojky a filtru, jejichž emisní pásmo má maximum intenzity při 254 nm nebo 365 nm. Použitá lampa umožňuje spolehlivou detekci standardní skvrny salicylanu sodného o průměru asi 5 mm na vrstvě *silikagelu* G *R*, pokud se skvrna pozoruje v běžné poloze vzhledem ke zdroji záření.

Pro ověřování tohoto požadavku se nanáší 5 μl roztoku *salicylanu sodného R* (0,4 g/l) v *lihu 96% R*[2] pro lampy s maximem při 254 nm a 5 μl roztoku (2 g/l) v *lihu 96% R*[2] pro lampy s maximem při 365 nm. Vzdálenost mezi lampou a chromatografickou deskou nastavená při zkoušce uvedené v lékopisném článku nemá být větší než vzdálenost nastavená při tomto ověřování.

2.1.4 Síta

Používají se síta se čtvercovými otvory zhotovená z vhodných materiálů. Pro jiné než analytické účely mohou být použita síta s kruhovými otvory, jejichž vnitřní průměry jsou 1,25násobky velikosti čtvercových otvorů odpovídajícího síta. Materiál, z kterého jsou síta zhotovena, nesmí reagovat s prosívanou látkou. Stupeň rozdrobení je předepsán v jednotlivých článcích tak, že číslo síta, jehož hodnota odpovídá jmenovité velikosti otvorů v mikrometrech, je uvedeno v závorce za názvem látky.

Mezní úchylka[3] velikosti otvorů pro jednotlivý otvor (+*X*): velikost otvorů nepřesahuje jmenovitou velikost otvorů o více než *X*, které se vypočítá ze vztahu:

$$X = \frac{2\ (w^{0,75})}{3} + 4\ (w^{0,25})\ ,$$

v němž značí:
w - velikost otvorů v μm.

Mezní úchylka velikosti otvorů pro průměrnou velikost otvorů (± *Y*): průměrná velikost otvorů se neodchyluje od jmenovité velikosti otvorů o více než ± *Y*, které se vypočítá ze vztahu:

$$Y = \frac{w^{0,98}}{27} + 1,6\ .$$

---

[2] Použitý líh 96% *R* nesmí vykazovat žádnou fluorescenci.

[3] Mezinárodní norma ISO 3310/1 (1975)
ČSN ISO 3310/1 (1994)

Tab. 2.1.4-1

Číslo síta (jmenovitá velikost otvorů)	Mezní úchylky velikosti otvorů			Průměr drátů d		
	pro jednotlivý otvor $+X$	pro průměrný otvor $+Y$	střední mezní úchylka $+Z$	doporučené d_{jmen}	rozpětí volby	
					d_{max}	d_{min}
11 200	770	350	560	2 500	2 900	2 100
8 000	600	250	430	2 000	2 300	1 700
5 600	470	180	320	1 600	1 900	1 300
4 000	370	130	250	1 400	1 700	1 200
2 800	290	90	190	1 120	1 300	950
2 000	230	70	150	900	1 040	770
1 400	180	50	110	710	820	600
1 000	140	30	90	560	640	480
710	112	25	69	450	520	380
500	89	18	54	315	360	270
355	72	13	43	224	260	190
250	58	9,9	34	160	190	130
180	47	7,6	27	125	150	106
125	38	5,8	22	90	104	77
90	32	4,6	18	63	72	54
63	26	3,7	15	45	52	38
45	22	3,1	13	32	37	27
38	-	-	-	30	35	24

Číselné hodnoty uvedeny v mikrometrech

Střední mezní úchylka ($\pm Z$): nejvýše 6 % z celkového počtu otvorů smí mít velikost mezi "jmenovitou + X" a "jmenovitou + Z". Z je vyjádřeno vztahem:

$$Z = \frac{X + Y}{2} .$$

Průměr drátu (d): průměry drátu uvedené v tabulce se vztahují na protkávané kovové drátěné pletivo vsazené do rámu. Jmenovité průměry drátu se mohou lišit od těchto hodnot v mezích limitů d_{max} a d_{min}. Tyto limity definují přípustné rozpětí výběru přibližně ±15 % od jmenovitých hodnot. Dráty ve zkoušeném sítu musí mít přibližně stejné průměry v osnově a útku.

2.1.5 Zkumavky pro porovnávací zkoušky

Není-li předepsáno jinak, porovnávací zkoušky se provádějí ve zkumavkách z bezbarvého skla s vnitřním průměrem 16 mm, jejichž dno je ploché a průhledné. Pozorování se provádí v rozptýleném světle shora ve směru podélné osy zkumavky proti bílému nebo v případě potřeby černému pozadí.

2.1.6 Detekční trubičky pro plyny

Detekční trubičky pro plyny jsou zatavené trubičky vyrobené z průhledného inertního materiálu, které umožňují po odlomení zátavů průchod plynu. Obsahují zkoumadla adsorbovaná na inertních nosičích, která jsou vhodná k vizuální detekci sledované látky. Je-li to nutné, mohou obsahovat také předřazené chemické filtry k odstranění látek, které ruší detekci sledované látky. Detekční trubička pro plyny obsahuje buď jedno zkoumadlo pro detekci dané látky, nebo více zkoumadel pro detekci několika různých látek (jednovrstvá nebo vícevrstvá trubička).

Zkouška se provádí průchodem předepsaného objemu zkoušeného plynu detekční trubičkou. Délka zbarvené vrstvy nebo intenzita barevné změny indikuje na dělené stupnici přítomnost sledovaných látek a udává jejich přibližný obsah v plynu.

Kalibrace detekčních trubiček se ověřuje podle instrukcí výrobce.

Pracovní podmínky. Zkouška se provádí podle instrukcí výrobce nebo podle následujícího postupu.

Zdroj plynu se připojí k vhodnému regulátoru tlaku a jehlovému ventilu. Ohebná hadička zakončená dílem Y se připojí k jehlovému ventilu a průtok zkoušeného plynu se seřídí tak, aby procházel hadičkou vhodnou rychlostí, viz obrázek 2.1.6-1. Připraví se detekční trubička a připojí se k měřicí pumpičce podle instrukcí výrobce. Volný konec detekční trubičky se krátkou hadičkou připojí k druhému konci dílu Y. Pumpičkou se provede potřebný počet nasátí plynu tak, aby detekční trubičkou prošel vhodný objem zkoušeného plynu. Odečte se hodnota udaná délkou zabarvené vrstvy nebo intenzitou zabarvení na dělené stupnici. V případě negativního výsledku mohou být detekční trubičky ověřeny pomocí kalibračního plynu, který obsahuje sledovanou látku. Pro ověření detekční trubičky ke stanovení oleje se použije jiná detekční trubička ze stejné výrobní šarže.

Trubička pro detekci oxidu uhličitého. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro hydrazin a violeť krystalovou jako detekční zkoumadla. Nejmenší zjistitelná hodnota je 100 ml/m^3 s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±15 %.

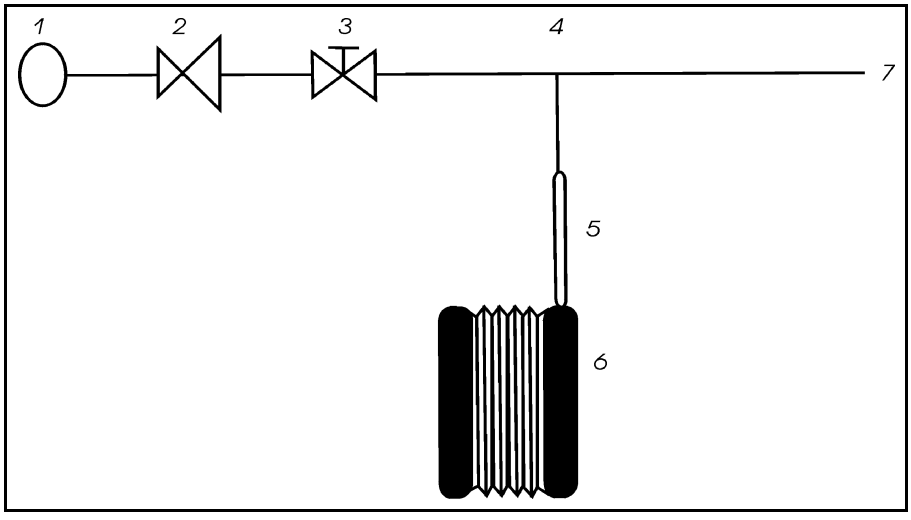
Trubička pro detekci oxidu siřičitého. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro jod a škrob jako detekční zkoumadla. Nejmenší zjistitelná hodnota je 0,5 ml/m^3 s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±15 %.

Trubička pro detekci oleje. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro kyselinou sírovou jako detekční zkoumadlo. Nejmenší zjistitelná hodnota je 0,1 mg/m^3 s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±30 %.

Trubička pro detekci oxidu dusnatého a oxidu dusičitého. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro oxidační vrstvu (sůl šestimocného chromu) a pro difenylbenzidin jako detekční zkoumadla. Nejmenší zjistitelná hodnota je 0,5 ml/m^3 s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±15 %.

Trubička pro detekci oxidu uhelnatého. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro oxid jodičný, oxid seleničitý a kyselinu sírovou jako detekční zkoumadla. Nejmenší zjistitelná hodnota je 0,5 ml/m^3 (popř. méně) s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±15 %.

Trubička pro detekci sirovodíku. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro olovnatou sůl jako detekční zkoumadlo. Nejmenší zjistitelná hodnota je 1 ml/m^3 (popř. méně) s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±10 %.



Obr. 2.1.6-1

1. zdroj plynu
2. regulátor tlaku
3. jehlový ventil
4. spojovací díl Y
5. detekční trubička
6. pumpička pro prosávání plynu trubičkou
7. výstup do atmosféry

Trubička pro detekci vodních par. Je skleněná zatavená trubička obsahující adsorpční filtry a vhodné nosiče pro chloristan hořečnatý jako detekční zkoumadlo. Nejmenší zjistitelná hodnota je 60 ml/m^3 (popř. méně) s relativní směrodatnou odchylkou téměř ±20 %.

2.2 Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

2.2.1 Čirost a stupeň opalescence tekutin

Použijí se stejné zkumavky z bezbarvého průhledného neutrálního skla s plochým dnem a s vnitřním průměrem 15 mm až 25 mm. Porovnává se zkoušená tekutina s čerstvě připravenou porovnávací suspenzí (příprava popsána níže) při výšce vrstvy 40 mm. Roztok se porovnává v rozptýleném denním světle za 5 min po přípravě porovnávací suspenze shora ve směru podélné osy zkumavky proti černému pozadí. Rozptyl světla má být takový, aby bylo možno snadno rozlišit porovnávací suspenzi I od *vody R* a porovnávací suspenzi II od porovnávací suspenze I.

Tekutina je čirá, jestliže její čirost je stejná jako u *vody R* nebo použitého rozpouštědla, zkoušeno za podmínek výše uvedených, nebo jestliže nejeví silnější opalescenci než porovnávací suspenze I.

Zkoumadla

Roztok hydraziniumsulfatu. 1,000 g *hydraziniumsulfatu R* se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 100,0 ml. Nechá se stát 4 až 6 h.
Roztok methenaminu. V kuželové baňce na 100 ml se skleněným uzávěrem se rozpustí 2,500 g *methenaminu R* v 25,0 ml *vody R*.
Základní suspenze pro opalescenci. K roztoku methenaminu v baňce se přidá 25,0 ml roztoku hydraziniumsulfatu. Promíchá se a nechá se stát 24 h. Tato základní suspenze je stálá dva měsíce. Uchovává se ve skleněných nádobách s intaktním povrchem. Suspenze nesmí přilnout ke stěně nádoby a před použitím se musí dobře promíchat.
Standard pro opalescenci. 15,0 ml základní suspenze pro opalescenci se doplní *vodou R* do 1000,0 ml. Čerstvě připravená suspenze může být uchovávána nejdéle 24 h.
Porovnávací suspenze. Připraví se v čas potřeby podle následující tab. 2.2.1-1 smícháním obou složek a protřepáním před použitím.

Tab. 2.2.1-1

	I	II	III	IV
Standard pro opalescenci *Voda R*	5,0 ml 95,0 ml	10,0 ml 90,0 ml	30,0 ml 70,0 ml	50,0 ml 50,0 ml

2.2.2 Stupeň zbarvení tekutin

Hodnocení stupně zbarvení tekutin v barevné řadě hnědá, žlutá, červená se provádí jednou ze dvou metod níže uvedených, předepsaných v jednotlivých článcích.

Tekutina je bezbarvá, jestliže je stejného vzhledu jako *voda R* nebo rozpouštědlo, nebo není-li více zbarvena než porovnávací barevný roztok H_9 (tab. 2.2.2-2).

Metoda I

Použijí se stejné zkumavky z bezbarvého průhledného neutrálního skla s vnějším průměrem 12 mm. Porovnávají se 2,00 ml zkoušené tekutiny s 2,00 ml *vody R* nebo rozpouštědla nebo

porovnávacího barevného roztoku (viz tabulky porovnávacích barevných roztoků), jak je předepsáno v článku. Porovnávání se provádí v rozptýleném denním světle proti bílému pozadí kolmo k podélné ose zkumavky.

Metoda II

Použijí se stejné zkumavky z bezbarvého průhledného neutrálního skla s plochým dnem a s vnitřním průměrem 15 mm až 25 mm. Porovnává se zkoušená tekutina s *vodou R* nebo rozpouštědlem nebo s porovnávacím barevným roztokem (viz tabulky porovnávacích barevných roztoků). Výška vrstvy je 40 mm. Porovnávání se provádí v rozptýleném denním světle proti bílému pozadí shora ve směru podélné osy zkumavky.

Zkoumadla

Základní barevné roztoky

Žlutý roztok

46,0 g *chloridu železitého R* se rozpustí v asi 900 ml směsi 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 975,0 ml *vody R* a doplní se do 1000,0 ml stejnou směsí. Titračně se stanoví skutečný obsah, který se upraví přidáním stejné směsi na 45,0 mg $FeCl_3 . 6H_2O$/ml. Roztok se uchovává chráněn před světlem.

Stanovení obsahu. K 10,0 ml připraveného roztoku v 250ml kuželové baňce se zabroušenou zátkou se přidá 15,0 ml *vody R*, 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 4,0 g *jodidu draselného R*. Baňka se uzavře, nechá se stát 15 min v temnu a poté se přidá 100 ml *vody R*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml roztoku *škrobu R* jako indikátoru, který se přidá před koncem titrace.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,03 mg $FeCl_3 . 6H_2O$.

Červený roztok

60,0 g *chloridu kobaltnatého R* se rozpustí asi v 900 ml směsi 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 975,0 ml *vody R* a doplní se do 1000,0 ml stejnou směsí. Titračně se stanoví skutečný obsah, který se upraví přidáním stejné směsi na 59,5 mg $CoCl_2 . 6H_2O$/ml.

Stanovení obsahu. K 5,0 ml připraveného roztoku v 250ml kuželové baňce se zabroušenou zátkou se přidá 5,0 ml *peroxidu vodíku zředěného R*, 10,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (300 g/l) a opatrně se vaří 10 min. Po ochlazení se přidá 60 ml *kyseliny sírové zředěné R* a 2,0 g *jodidu draselného R*. Baňka se uzavře a vzniklá sraženina se rozpustí mírným třepáním. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *škrobu RS* jako indikátoru, který se přidá před koncem titrace. Titruje se do vzniku růžového zbarvení.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,79 mg $CoCl_2 . 6H_2O$.

Modrý roztok

63,0 g *síranu měďnatého R* se rozpustí asi v 900 ml směsi 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 975,0 ml *vody R* a doplní se do 1000,0 ml stejnou směsí. Stanoví se skutečný obsah, který se upraví přidáním stejné směsi na 62,4 mg $CuSO_4 . 5H_2O$/ml.

Stanovení obsahu. K 10,0 ml připraveného roztoku v 250ml kuželové baňce se zabroušenou zátkou se přidá 50,0 ml *vody R*, 12,0 ml *kyseliny octové zředěné R* a 3,0 g *jodidu draselného R*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *škrobu RS* jako indikátoru, který se přidá před koncem titrace. Titruje se do vzniku slabě hnědého zbarvení.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,97 mg $CuSO_4 . 5H_2O$.

Standardní barevné roztoky

Smícháním tří základních barevných roztoků se připraví pět standardních barevných roztoků (tab. 2.2.2-1).

Tab. 2.2.2-1

Standardní barevný roztok	Množství roztoku v ml			
	žlutý roztok	červený roztok	modrý roztok	kyselina chlorovodíková 10 g/l
H (hnědý)	3,0	3,0	2,4	1,6
HŽ (hnědožlutý)	2,4	1,0	0,4	6,2
Ž (žlutý)	2,4	0,6	0,0	7,0
ZŽ (zelenožlutý)	9,6	0,2	0,2	0,0
Č (červený)	1,0	2,0	0,0	7,0

Porovnávací barevné roztoky pro metody I a II

Zředěním standardních barevných roztoků se připraví porovnávací barevné roztoky (tab. 2.2.2-2 až 2.2.2-6).

Tab. 2.2.2-2 Porovnávací barevné roztoky H

Porovnávací barevný roztok	Množství roztoku v ml	
	standardní roztok H	kyselina chlorovodíková 10 g/l
H_1	75,0	25,0
H_2	50,0	50,0
H_3	37,5	62,5
H_4	25,0	75,0
H_5	12,5	87,5
H_6	5,0	95,0
H_7	2,5	97,5
H_8	1,5	98,5
H_9	1,0	99,0

Tab. 2.2.2-3 Porovnávací barevné roztoky HŽ

Porovnávací barevný roztok	Množství roztoku v ml	
	standardní roztok HŽ	kyselina chlorovodíková 10 g/l
$HŽ_1$	100,0	0,0
$HŽ_2$	75,0	25,0
$HŽ_3$	50,0	50,0
$HŽ_4$	25,0	75,0
$HŽ_5$	12,5	87,5
$HŽ_6$	5,0	95,0
$HŽ_7$	2,5	97,5

Tab. 2.2.2-4 Porovnávací barevné roztoky Ž

Porovnávací barevný roztok	Množství roztoku v ml	
	standardní roztok Ž	kyselina chlorovodíková 10 g/l
$Ž_1$	100,0	0,0
$Ž_2$	75,0	25,0
$Ž_3$	50,0	50,0
$Ž_4$	25,0	75,0
$Ž_5$	12,5	87,5
$Ž_6$	5,0	95,0
$Ž_7$	2,5	97,5

Tab. 2.2.2-5 Porovnávací barevné roztoky ZŽ

Porovnávací barevný roztok	Množství roztoku v ml	
	standardní roztok ZŽ	kyselina chlorovodíková 10 g/l
$ZŽ_1$	25,0	75,0
$ZŽ_2$	15,0	85,0
$ZŽ_3$	8,5	91,5
$ZŽ_4$	5,0	95,0
$ZŽ_5$	3,0	97,0
$ZŽ_6$	1,5	98,5
$ZŽ_7$	0,75	99,25

Tab. 2.2.2-6 Porovnávací barevné roztoky Č

Porovnávací barevný roztok	Množství roztoku v ml	
	standardní roztok Č	kyselina chlorovodíková 10 g/l
$Č_1$	100,0	0,0
$Č_2$	75,0	25,0
$Č_3$	50,0	50,0
$Č_4$	37,5	62,5
$Č_5$	25,0	75,0
$Č_6$	12,5	87,5
$Č_7$	5,0	95,0

Uchovávání

Pro metodu I mohou být porovnávací barevné roztoky uchovávány v těsně uzavřených zkumavkách z bezbarvého průhledného neutrálního skla s vnějším průměrem 12 mm chráněných před světlem.

Pro metodu II se připravují porovnávací barevné roztoky těsně před použitím se standardních barevných roztoků.

2.2.3 Potenciometrické stanovení pH

Hodnota pH udává pomocí konvenčně stanovené logaritmické stupnice aktivitu hydroxoniových iontů ve vodném roztoku. Pro praktické účely se používá konvenční stupnice pH. Hodnota pH zkoušeného roztoku je vztažena na hodnotu pH referenčního roztoku (pH_s) podle vzorce:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k} ,$$

v němž značí:
E - potenciál článku se zkoušeným roztokem vyjádřený ve voltech,
E_s - potenciál článku s roztokem o známém pH_s rovněž ve voltech,
k - konstanta závislá na teplotě.

Tab. 2.2.3-1 Hodnoty *k* při různých teplotách

Teplota °C	*k*
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0601
35	0,0611

Při potenciometrickém stanovení pH se měří rozdíl potenciálu mezi dvěma vhodnými elektrodami ponořenými do zkoušeného roztoku. Jedna z elektrod (indikační) je citlivá na vodíkové (hydroxoionové) ionty (obvykle elektroda skleněná) a druhá je srovnávací elektroda (např. nasycená kalomelová elektroda).

Přístroj. Měřicím přístrojem je voltmetr s vnitřním odporem nejméně 100násobně větším než odpor použitých elektrod. Je kalibrován v jednotkách pH a jeho rozlišovací schopnost musí být nejméně 0,05 jednotek pH (nebo nejméně 0,003 V).

Postup. Není-li v článku uvedeno jinak, provádějí se všechna měření při stejné teplotě (20 °C až 25 °C). Tab. 2.2.3-2 vyjadřuje změny pH v závislosti na teplotě u řady referenčních tlumivých roztoků používaných pro kalibraci přístroje. Pro případnou korekci na teplotu je třeba se řídit instrukcemi výrobce. Přístroj se kalibruje tlumivým roztokem hydrogenftalanu draselného (primární standard) a jedním z dalších tlumivých roztoků rozdílného pH (přednostně jedním z roztoků uvedených v tab. 2.2.3-2). Naměřená hodnota pH třetího tlumivého roztoku, jehož pH leží mezi oběma uvedenými hodnotami pH tlumivých roztoků, se nesmí lišit o více než 0,05 jednotek pH od skutečné hodnoty tohoto roztoku. Ponoření elektrod do měřeného roztoku a odečítání je třeba provádět za stejných podmínek jako u roztoků tlumivých.

Při častém používání přístroje se kontrola jeho kalibrace provádí pravidelně. V opačném případě je třeba provádět tyto kontroly před každým měřením.

Všechny zkoušené a referenční tlumivé roztoky se připravují z *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Příprava referenčních tlumivých roztoků

Tetraoxalat draselný 0,05 mol/l. 12,61 g $C_4H_3KO_8 . 2H_2O$ se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml.

Hydrogenvínan draselný nasycený při 25 °C. Nadbytek $C_4H_5KO_6$ se intenzivně protřepává s *vodou R* při 25 °C. Přefiltruje se nebo dekantuje. Připravuje se těsně před použitím.

Dihydrogencitronan draselný 0,05 mol/l. 11,41 g $C_6H_7KO_7$ se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml. Připravuje se těsně před použitím.

Hydrogenftalan draselný 0,05 mol/l. 10,13 g $C_8H_5KO_4$ vysušeného při 110 °C až 135 °C se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml.

Dihydrogenfosforečnan draselný 0,025 mol/l + hydrogenfosforečnan sodný 0,025 mol/l. 3,39 g KH_2PO_4 a 3,53 g Na_2HPO_4, oba vysušené po dobu 2 h při 110 °C až 130 °C, se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml.

Dihydrogenfosforečnan draselný 0,0087 mol/l + hydrogenfosforečnan sodný 0,0303 mol/l. 1,18 g KH_2PO_4 a 4,30 g Na_2HPO_4, oba vysušené po dobu 2 h při 110 °C až 130 °C, se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml.

Tetraboritan sodný 0,01 mol/l. 3,80 g $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$ se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml. Uchovává se chráněn před vzdušným oxidem uhličitým.

Uhličitan sodný 0,025 mol/l + hydrogenuhličitan sodný 0,025 mol/l. 2,64 g Na_2CO_3 a 2,09 g $NaHCO_3$ se rozpustí ve *vodě R* a doplní se jí do 1000,0 ml.

Tab. 2.2.3-2 pH referenčních tlumivých roztoků při různých teplotách

Teplota (°C)	Tetraoxalat draselný 0,05 mol/l $C_4H_3KO_8 \cdot 2H_2O$	Hydrogenvínan draselný (nasycený při 25 °C) $C_4H_5KO_6$	Dihydrogen-citronan draselný 0,05 mol/l $C_6H_7KO_7$	Hydrogenftalan draselný 0,05 mol/l $C_8H_5KO_4$	Dihydrogen-fosforečnan draselný 0,025 mol/l + hydrogenfosfo-rečnan sodný 0,025 mol/l $KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	Dihydrogen-fosforečnan draselný 0,0087 mol/l + hydrogenfosfo-rečnan sodný 0,0303 mol/l $KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	Tetraboritan sodný 0,01 mol/l $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	Uhličitan sodný 0,025 mol/l + hydrogen-uhličitan sodný 0,025 mol/l $Na_2CO_3 + NaHCO_3$
15	1,67		3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12
20	1,68		3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06
25	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01
30	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97
35	1,69	3,55	3,76	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93
$\frac{\Delta pH}{\Delta t}$ *	+0,001	-0,0014	-0,0022	+0,0012	-0,0028	-0,0028	-0,0082	-0,0096

* Změna pH na 1 °C

2.2.4 Vztah mezi reakcí roztoku, přibližnými hodnotami pH a zabarvením některých indikátorů

K 10 ml zkoušeného roztoku se přidá 0,1 ml indikátoru, pokud není předepsáno v tab. 2.2.4-1 jinak.

Tab. 2.2.4-1

Reakce	pH	Indikátor	Zabarvení
zásaditá	> 8	lakmusový papír thymolová modř	modré šedé nebo fialově modré
slabě zásaditá	8,0 - 10,0	fenolftalein* thymolová modř	bezbarvé až růžové šedé
silně zásaditá	> 10	fenolftaleinový papír thymolová modř	červené fialově modré
neutrální	6,0 - 8,0	methylová červeň fenolová červeň*	žluté žluté nebo růžové
neutrální na tropeolin OO	> 3,0	tropeolin OO	žluté
neutrální na dimethylovou žluť	> 4,0	dimethylová žluť*	žluté; červené po přidání 0,1 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l
neutrální na methylovou červeň	4,5 - 6,0	methylová červeň	oranžově červené
neutrální na fenolftalein	< 8,0	fenolftalein*	bezbarvé; růžové nebo červené po přidání 0,05 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l
kyselá	< 6,0	methylová červeň bromthymolová modř**	oranžové nebo červené žluté
slabě kyselá	4,0 - 6,0	methylová červeň bromkrezolová zeleň	oranžové zelené nebo modré
silně kyselá	< 4	papír s červení Kongo dimethylová žluť*	zelené nebo modré oranžové nebo červené

* Použije se 0,05 ml.
** Použije se roztok bromthymolové modři *R1*.

2.2.5 Relativní hustota

Relativní hustota d_{20}^{20} látky je poměr hmotnosti určitého objemu látky k hmotnosti stejného objemu vody při 20 °C.

Relativní hustota d_{20}^{20} se stanoví s přesností na tolik desetinných míst, kolik je uvedeno v článku, pomocí pyknometru, hydrostatické váhy nebo hustoměru. Tlak vzduchu se při stanovení nebere v úvahu, což může do měření vnést chybu 1 jednotky na třetím desetinném místě.

Obvykle se používají ještě následující dvě definice.

Relativní hustota d_{4}^{20} látky je poměr hmotnosti určitého objemu látky při 20 °C k hmotnosti stejného objemu vody při 4 °C.

Hustota ϱ_{20} látky je poměr její hmotnosti k jejímu objemu při 20 °C. Udává se v kilogramech na krychlový metr (1 $kg.m^{-3} = 10^{-3}$ $g.cm^{-3}$).

Číselné vztahy mezi relativní hustotou a hustotou udávanou v kilogramech na krychlový metr jsou:

$$\varrho_{20} = 998{,}202\ d_{20}^{20} \text{ nebo } d_{20}^{20} = 1{,}001\,80 \,.\, 10^{-3}\ \varrho_{20}$$

$$\varrho_{20} = 999{,}972\ d_{4}^{20} \text{ nebo } d_{4}^{20} = 1{,}000\,03 \,.\, 10^{-3}\ \varrho_{20}$$

$$d_{4}^{20} = 0{,}998\,230\ d_{20}^{20}\ .$$

2.2.6 Index lomu

Index lomu n_{λ}^{t} prostředí vztažený na vzduch se udává jako poměr sinu úhlu dopadu paprsku světla ve vzduchu k sinu úhlu lomu paprsku světla v daném prostředí.

Pokud není uvedeno jinak, měří se index lomu při (20 ± 0,5) °C při vlnové délce D-linie sodíkového světla (λ = 589,3 nm); užívaný symbol je potom n_{D}^{20}.

Přístroje na měření indexu lomu - refraktometry - obvykle stanovují mezní úhel. Základní částí těchto přístrojů je hranol o známém indexu lomu, který je ve styku se zkoušenou kapalinou.

Ke kalibraci přístroje se použijí referenční kapaliny uvedené v tab. 2.2.6-1. Hodnota indexu lomu každé referenční kapaliny je uvedena na štítku jejího balení.

Tab. 2.2.6-1

Referenční kapalina	$\Delta n/\Delta t$ (teplotní koeficient)
trimethylpentan CRL	-0,000 49
chlorid uhličitý CRL	-0,000 57
toluen CRL	-0,000 56
methylnaftalen CRL	-0,000 48

Při použití bílého světla je refraktometr vybaven příslušným kompenzačním zařízením. Přístroj umožňuje přesný odečet nejméně na tři desetinná místa a je vybaven zařízením umožňujícím práci při předepsané teplotě. Stupnice teploměru je dělena po 0,5 °C nebo přesněji.

2.2.7 Optická otáčivost

Optická otáčivost je vlastnost některých látek otáčet rovinu polarizovaného světla.

Specifická optická otáčivost $[\alpha_m]_\lambda^t$ je otáčivost vyjádřená v radiánech (rad), měřená při teplotě *t*, při vlnové délce λ a tloušťce vrstvy 1 metr, kterou vykazuje kapalina nebo roztok obsahující 1 kilogram opticky aktivní látky v krychlovém metru roztoku. Pro praktické využití se specifická optická otáčivost $[\alpha_m]_\lambda^t$ obvykle vyjadřuje v miliradiánech a čtverečných metrech na kilogram (mrad.m^2.kg^{-1}).

Lékopis přijal následující konvenční definice:

Úhel optické otáčivosti kapaliny je úhel otočení α roviny polarizovaného světla vyjádřený ve stupních (°) při vlnové délce D-linie sodíkového světla (λ = 589,3 nm) měřený při 20 °C a tloušťce vrstvy 1 decimetr; pro roztok je postup přípravy popsaný v článku.

Specifická optická otáčivost $[\alpha]_D^{20}$ kapaliny je úhel otočení α roviny polarizovaného světla vyjádřený ve stupních (°) při vlnové délce D-linie sodíkového světla (λ = 589,3 nm), měřený při 20 °C ve zkoušené kapalině, vypočítaný pro vrstvu tloušťky 1 decimetr a dělený hustotou vyjádřenou v gramech na krychlový centimetr.

Specifická optická otáčivost $[\alpha]_D^{20}$ látky v roztoku je úhel otočení α roviny polarizovaného světla vyjádřený ve stupních (°) při vlnové délce D-linie sodíkového světla (λ = 589,3 nm), měřený při 20 °C v roztoku zkoušené látky a vypočtený pro vrstvu tloušťky 1 decimetr, obsahující 1 gram látky na mililitr. Specifická optická otáčivost pevné látky je vždy vyjádřena pro dané rozpouštědlo a pro danou koncentraci rozpuštěné látky.

V konvenčním systému přijatém lékopisem se specifická optická otáčivost vyjadřuje ve stupních krát mililitry na decimetr a gram [(°).ml.dm^{-1}.g^{-1}].

Přepočítávací faktor z mezinárodního systému na systém lékopisný je následující:

$$[\alpha_m]_\lambda^t = [\alpha]_\lambda^t \,.\, 0{,}1745 \,.$$

V určitých případech specifikovaných v článcích smí být úhel otočení měřen při jiné teplotě než 20 °C a při jiných vlnových délkách.

Polarimetr umožňuje odečítání s přesností nejméně na 0,01°. Stupnice je obyčejně kontrolovaná pomocí ověřených křemenných destiček. Linearita stupnice se může kontrolovat pomocí roztoků sacharosy.

Postup. Stanoví se nulová poloha polarimetru a úhel otočení roviny polarizovaného světla při vlnové délce D-linie sodíkového světla (λ = 589,3 nm) při (20 ± 0,5) °C. Měření se může uskutečnit při jiných teplotách jen tehdy, jestliže článek uvádí korekci naměřené optické otáčivosti na tuto teplotu.

Stanoví se nulová poloha přístroje s uzavřenou trubicí; pro kapaliny se nulová poloha stanoví s prázdnou trubicí a pro látky v roztoku s trubicí naplněnou předepsaným rozpouštědlem. Vypočítá se průměr alespoň z pěti měření.

Specifická optická otáčivost se vypočítá pomocí následujících vzorců, pravotočivost a levotočivost se označí (+), resp. (-).

Pro kapaliny:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \,.\, \rho_{20}} \,.$$

Pro pevné látky v roztoku:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000\alpha}{l \,.\, c} \,.$$

Obsah opticky aktivní látky *c* vyjádřený v g/l nebo *c'* vyjádřený v procentech se vypočítá podle následujících vzorců:

$$c = \frac{1000\alpha}{l \,.\, [\alpha]_D^{20}}, \qquad c' = \frac{100\alpha}{l \,.\, [\alpha]_D^{20} \,.\, \rho_{20}}.$$

Ve všech uvedených vzorcích značí:

α - úhel otočení ve stupních při (20 ± 0,5) °C,
l - délku polarimetrické trubice v decimetrech,
ϱ_{20} - hustotu při 20 °C v gramech na krychlový centimetr; pro účely lékopisu je hustota nahrazena relativní hustotou *(2.2.5)*,
c - koncentraci látky v g/l,
c' - koncentraci látky v %.

2.2.8 Viskozita

Dynamická viskozita nebo *koeficient viskozity* η je tangenciální síla připadající na jednotku povrchu a vyjádřená jako *smykové napětí* τ v pascalech, potřebná k tomu, aby se dvě rovnoběžné vrstvy kapaliny o ploše 1 m^2 navzájem posunuly o vzdálenost 1 m (x) rychlostí (v) 1 $m.s^{-1}$.

Rychlostní gradient dv/dx udává smykový poměr D a vyjadřuje se v s^{-1}. Pro dynamickou viskozitu η platí vztah $\eta = \tau/D$.

Jednotkou dynamické viskozity je pascalsekunda (Pa.s). Nejpoužívanější menší jednotkou je milipascalsekunda (mPa.s).

Kinematická viskozita ν (m^2/s) je poměr dynamické viskozity η a hustoty ρ (kg/m^3) kapaliny při téže teplotě. Pro kinematickou viskozitu platí vztah $\nu = \eta/\rho$. Kinematická viskozita se obvykle vyjadřuje v $mm^2.s^{-1}$.

Kapilární viskozimetr lze používat pro stanovení viskozity newtonských kapalin a rotační viskozimetr pro stanovení viskozity newtonských i nenewtonských kapalin.

Jiné viskozimetry lze používat za předpokladu, že jejich přesnost není menší než ta, kterou poskytují viskozimetry popsané níže.

2.2.9 Měření kapilárním viskozimetrem

Stanovení viskozity pomocí vhodného kapilárního viskozimetru se provádí při teplotě (20 ± 0,1) °C, není-li předepsáno jinak. Čas potřebný k tomu, aby hladina kapaliny klesla od jedné značky ke druhé, se měří stopkami s přesností na 0,2 sekundy. Měření je platné, pokud se dvě po sobě jdoucí měření neliší o více než 1 %. Pro výpočet se bere průměr nejméně ze tří měření doby průtoku zkoušené kapaliny.

Dynamická viskozita η (*2.2.8*) v milipascalsekundách (mPa.s) se vypočítá podle vzorce:

$$\eta = k\rho t,$$

v němž značí:

k - konstantu viskozimetru ($mm^2.s^{-2}$),
ρ - hustotu zkoušené tekutiny ($mg.mm^{-3}$) získanou vynásobením relativní hustoty (d_{20}^{20}) číslem 0,9982,
t - dobu průtoku zkoušené kapaliny v sekundách.

Konstanta k se stanoví za použití vhodné viskozimetrické kalibrační kapaliny předepsané v lékopise.

K výpočtu kinematické viskozity ($mm^2.s^{-1}$) se použije vzorec:

$$\nu = kt.$$

Stanovení může být provedeno přístrojem (viz obr. 2.2.9-1, str. 105), který má parametry [1] uvedené v tab. 2.2.9-1.

Tab. 2.2.9-1

Číslo velikosti	Nominální konstanta viskozimetru	Rozmezí kinematické viskozity	Vnitřní průměr trubice R	Objem části C	Vnitřní průměr trubice N
	$mm^2.s^{-2}$	$mm^2.s^{-1}$	mm (±2 %)	ml (±5 %)	mm
1	0,01	3,5 až 10	0,64	5,6	2,8 až 3,2
1A	0,03	6 až 30	0,84	5,6	2,8 až 3,2
2	0,1	20 až 100	1,15	5,6	2,8 až 3,2
2A	0,3	60 až 300	1,51	5,6	2,8 až 3,2
3	1,0	200 až 1000	2,06	5,6	3,7 až 4,3
3A	3,0	600 až 3000	2,74	5,6	4,6 až 5,4
4	10	2000 až 10 000	3,70	5,6	4,6 až 5,4
4A	30	6000 až 30 000	4,07	5,6	5,6 až 6,4
5	100	20 000 až 100 000	6,76	5,6	6,8 až 7,5

Minimální doba průtoku pro velikost číslo 1 musí být 350 s; pro všechny další velikosti 200 s.

Postup. Trubicí (*L*) viskozimetru se naplní část A dostatečným množstvím zkoušené kapaliny vytemperované na teplotu 20 °C, pokud není uvedeno jinak. Hladina kapaliny v části (*B*) nesmí zasahovat do ústí ventilační trubice (*M*). Viskozimetr se ponoří do vodní lázně o teplotě (20 ± 0,1) °C, není-li uvedeno jinak, ve svislé poloze a nechá se temperovat nejméně 30 min, aby se teploty vyrovnaly. Trubice (*M*) se uzavře a hladina kapaliny v trubici (*N*) se vytlačí asi 8 mm nad značku (*E*). V této poloze se kapalina zadrží uzavřením horního ústí trubice (*N*) a otevřením trubice (*M*). Při vlastním měření se otevře trubice (*N*) a s přesností 0,2 s se změří stopkami časový interval mezi poklesem hladiny kapaliny od značky (*E*) po značku (*F*).

2.2.10 Měření rotačním viskozimetrem

Běžně užívané typy rotačních viskozimetrů jsou založeny na měření smykových sil v kapalném prostředí, umístěném mezi dva souosé válce, z nichž jeden je poháněn motorem a druhý je přinucen k otáčení rotací prvého. Za těchto podmínek se mírou viskozity nebo zdánlivé viskozity stává úhlová odchylka (*M*) válce přinuceného k otáčení, což odpovídá momentu síly vyjádřenému v newtonmetrech.

Pro laminární proudění je dynamická viskozita η vyjádřená v pascalsekundách dána vzorcem:

$$\eta = \frac{1}{\omega}\left(\frac{M}{4\pi.h}\right) \cdot \left(\frac{1}{R_A^2} - \frac{1}{R_B^2}\right),$$

v němž značí:

h - výšku ponoření válce přinuceného k otáčení v kapalném prostředí vyjádřenou v metrech,

R_A, R_B - poloměry válců v metrech, přičemž R_A je menší než R_B,

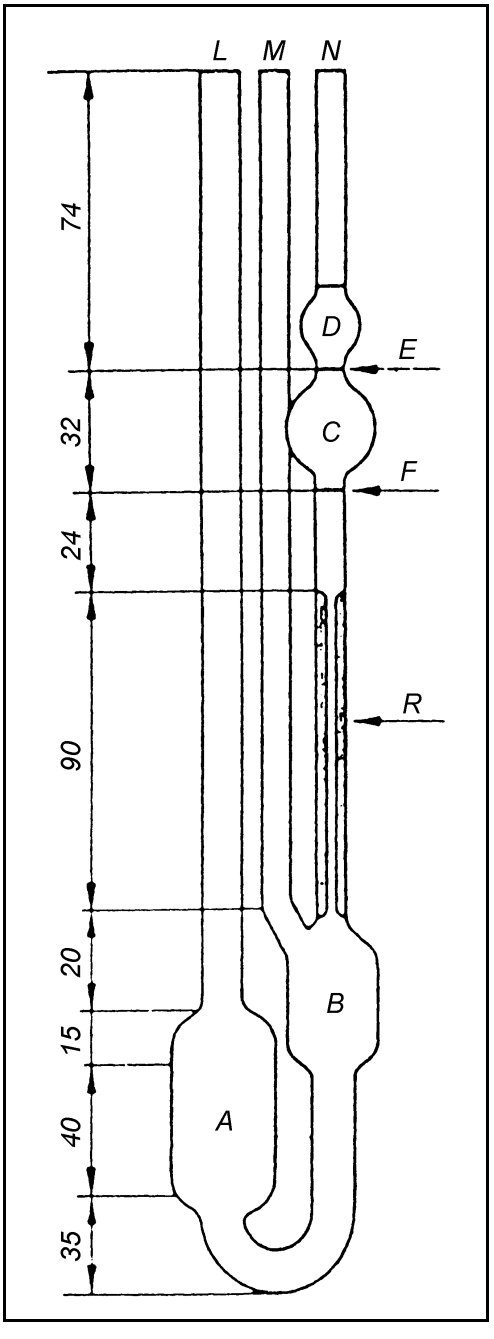
[1] Popisuje se zde systém navržený Mezinárodní organizací pro standardizaci (ISO).

ω - úhlovou rychlost v radiánech za sekundu.

Konstanta *k* přístroje[2)] může být určena při různých rychlostech otáčení za použití viskozimetrické kalibrační kapaliny předepsané lékopisem. Viskozita pak odpovídá vzorci:

$$\eta = k\frac{M}{\omega},$$

Postup. Viskozita se měří podle pokynů pro obsluhu rotačního viskozimetru. Teplota pro měření viskozity je předepsána v článku. Pro pseudoplastické a jiné nenewtonské systémy uvádí článek typ viskozimetru, který se má použít, a úhlovou rychlost nebo smykový poměr, při kterém se měření provádí. Jestliže je nemožné získat předepsaný smykový poměr přesně, použije se smykový poměr poněkud nižší a vyšší a provede se interpolace.



Obr. 2.2.9-1 Viskozimetr
Rozměry v milimetrech

2.2.11 Destilační rozmezí

Destilační rozmezí je teplotní interval vztažený na tlak 101,3 kPa (760 Torrů), ve kterém kapalina nebo její definovaná část destiluje za následujících podmínek.

Přístroj. Přístroj (viz obr. 2.2.11-1) se skládá z destilační baňky (A), k jejímuž postrannímu ramenu je vhodně připojen chladič (B) zakončený nebo nastavený hladce zahnutým nástavcem (C). Teploměr je vložený do hrdla baňky tak, aby horní konec rtuťové nádobky byl o 5 mm níže než spojení hrdla baňky se spodní stěnou boční trubice. Stupnice teploměru je dělená po 0,2 °C a její rozsah je asi 50 °C. Po dobu stanovení musí být baňka, včetně jejího hrdla, chráněna před průvanem vhodnou ochranou.

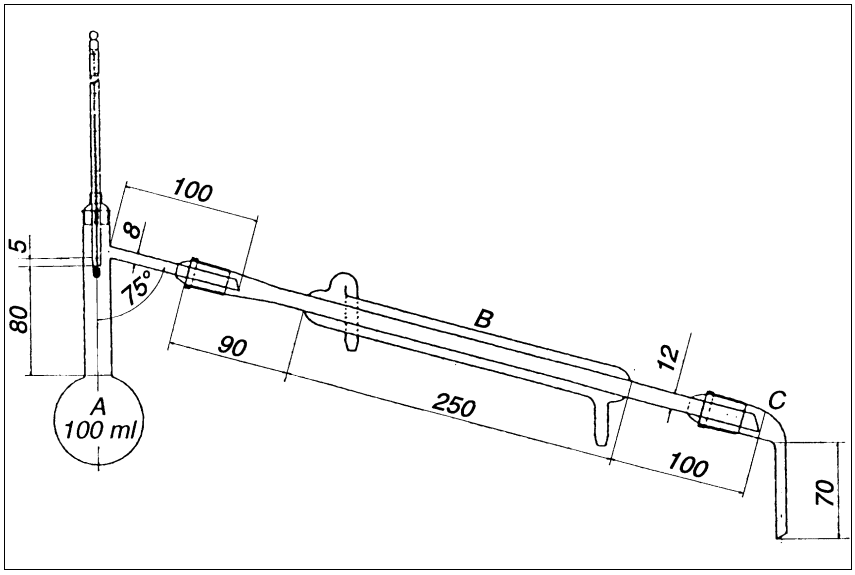
Postup. Do baňky (A) se dá 50,0 ml zkoušené kapaliny a několik kousků pórovité hmoty. Destilát se jímá do 50ml válce děleného po 1 ml. Chlazení tekoucí vodou je nevyhnutelné u kapalin destilujících níže než při 150 °C. Baňka se zahřívá tak, aby se rychle dosáhlo varu. Zaznamená se teplota, při které spadne do válce první kapka destilátu. Zahřívání se nastaví tak, aby kapalina destilovala konstantní rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min. Zaznamená se teplota, při které předestiloval celý objem kapaliny nebo její předepsaná část. Objem předestilované kapaliny se měří při 20 °C.

Zjištěná teplota se koriguje na předepsaný barometrický tlak podle vzorce:

$$t_1 = t_2 + k(101{,}3 - b),$$

[2)] K obchodně dostupnému přístroji jsou přiloženy tabulky udávající konstanty přístroje v závislosti na velikosti povrchové plochy použitých válců a na rychlosti jejich otáčení.

v němž značí:
t_1 - korigovanou teplotu,
t_2 - zjištěnou teplotu při barometrickém tlaku b,
k - korekční faktor dle tab. 2.2.11-1, pokud není uvedeno jinak,
b - barometrický tlak po dobu destilace (kPa).



Obr. 2.2.11-1 Přístroj na stanovení destilačního rozmezí
Rozměry v milimetrech

Tab. 2.2.11-1 Korekční faktor teploty v závislosti na tlaku

Destilační teplota	Korekční faktor k
do 100 °C	0,30
101 °C až 140 °C	0,34
141 °C až 190 °C	0,38
191 °C až 240 °C	0,41
nad 240 °C	0,45

2.2.12 Teplota varu

Teplota varu je teplota, při které tlak páry nad kapalinou je 101,3 kPa (760 Torrů).

Přístroj. Použije se stejný přístroj jako při stanovení destilačního rozmezí *(2.2.11)* mimo teploměru. Ten je vložen do hrdla baňky tak, že dolní konec rtuťové nádobky je v jedné rovině s dolním koncem hrdla destilační baňky. Baňka je umístěna na desce z izolačního materiálu s otvorem o průměru 35 mm.

Postup. Do baňky (A) se dá 20,0 ml zkoušené tekutiny a několik kousků pórovité hmoty (varné kaménky). Baňka se zahřívá tak, aby se co nejrychleji dosáhlo varu. Zaznamená se teplota, při které začne stékat kapalina v místě bočního ramene baňky do chladiče.

Zjištěná teplota se koriguje na předepsaný barometrický tlak podle vzorce:

$$t_1 = t_2 + k(101{,}3 - b),$$

v němž značí:
t_1 - korigovanou teplotu,
t_2 - teplotu zjištěnou při barometrickém tlaku b,
k - korekční faktor (viz tab. 2.2.11-1),
b - barometrický tlak zjištěný v době stanovení (kPa).

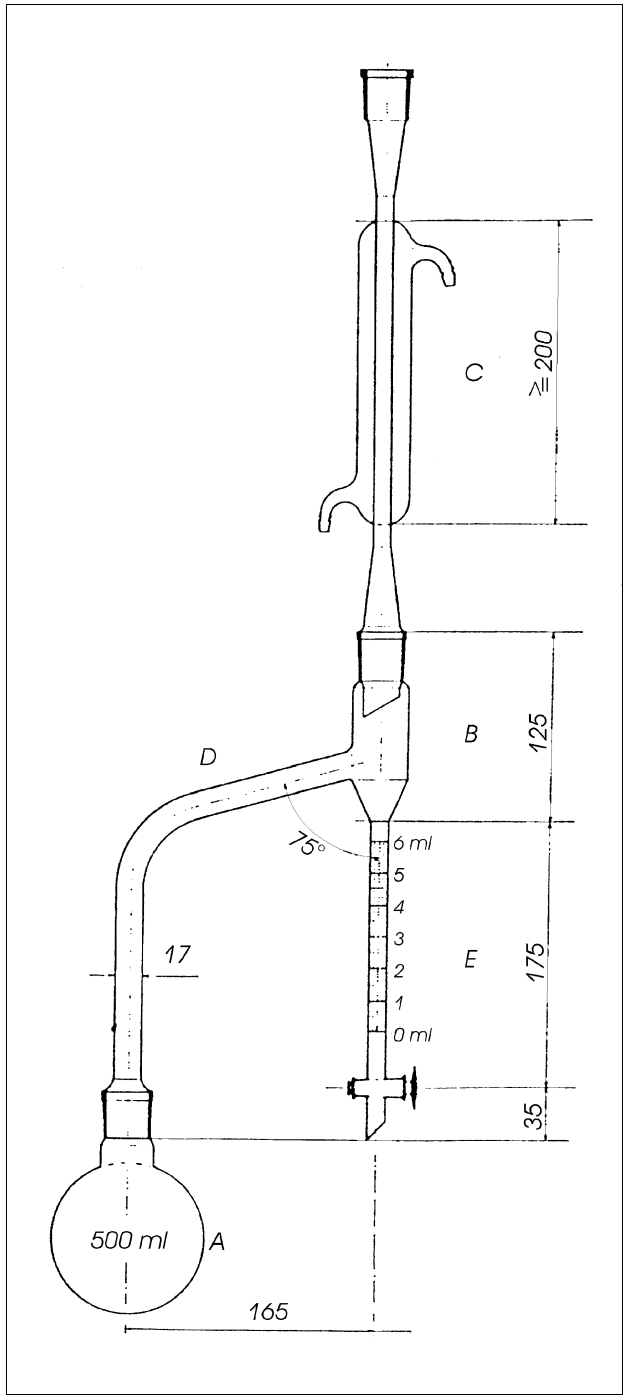
2.2.13 Stanovení vody destilací

Přístroj (viz obr. 2.2.13-1) se skládá ze skleněné baňky (A), která je připojena skleněnou trubicí (D) k cylindrické kondenzační části (B) zakončené odměrnou trubicí (E) s uzávěrem dělenou po 0,1 ml. Na zabroušené hrdlo části (B) je nasazen zpětný chladič (C). Jako zdroj tepla je vhodnější použít elektrický vařič s reostatem nebo olejovou lázeň. Horní část baňky a spojovací trubice (D) mohou být opatřeny tepelnou izolací.

Postup. Použije se přístroj dokonale vymytý a vysušený.

Do baňky se odměří 200 ml *toluenu R* a asi 2,0 ml *vody R*. Destiluje se dvě hodiny, potom se nechá asi 30 min chladit a odečte se množství předestilované vody s přesností na 0,05 ml.

Do baňky se kvantitativně vpraví množství zkoušené látky navážené s přesností 1 %, které obsahuje 2 ml až 3 ml *vody R*. Jestliže je zkoušená látka polotuhé konzistence, váží se na lodičce z kovové fólie. Přidá se několik kousků porézního materiálu a baňka se 15 min opatrně zahřívá. Když začne toluen vřít, destiluje se rychlostí asi 2 kapky/s, dokud se neoddestiluje většina vody, a potom se zvýší rychlost destilace asi na 4 kapky/s. Když byla předestilována všechna voda, opláchne se vnitřek chladiče *toluenem R*. Pokračuje se ještě 5 min v destilaci a pak se odstaví zdroj tepla. Odměrná trubice se nechá ochladit



Obr. 2.2.13-1 Přístroj pro stanovení vody destilací
Rozměry v milimetrech

na pokojovou teplotu a nechají se stéci všechny kapky vody ze stěn do odměrné trubice. Když se voda a toluen úplně oddělí, odečte se množství vody a vypočte se procentuální podíl vody v substanci podle vzorce:

$$\frac{100\ (n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:
m - hmotnost zkoušené látky v gramech,
n_1 - množství vody získané z první destilace v ml,
n_2 - celkové množství vody z obou destilací v ml.

2.2.14 Teplota tání - kapilární metoda

Teplota tání stanovená kapilární metodou je teplota, při které roztaje poslední částice sloupce léčiva v kapiláře.

Pokud je v článku předepsáno, použije se stejné zařízení i postup pro stanovení dalších faktorů, jako je tvorba menisku, nebo rozmezí teploty tání, které charakterizují chování léčiva při tání.

Zařízení. Zařízení se skládá z:
- vhodné skleněné nádoby obsahující kapalinovou lázeň (např. vodu, tekutý parafin nebo silikonový olej) vybavenou vhodným zahříváním;
- vhodného míchadla zabezpečujícího stejnoměrnou teplotu lázně;
- vhodného teploměru s dělením stupnice nepřevyšujícím interval 0,5 °C a značkou ponoru. Rozsah teploměru je v rozmezí maximálně 100 °C;
- kapilár z tvrdého skla prostého alkálií o vnitřním průměru od 0,9 mm do 1,1 mm a v tloušťce stěny od 0,10 mm do 0,15 mm, zatavených na jednom konci.

Postup stanovení. Pokud není předepsáno jinak, jemně upráškované léčivo se suší ve vakuu nad *silikagelem bezvodým R* po dobu 24 hod. Do kapiláry se vpraví dostatečné množství látky tak, aby vznikl sloupec o výšce 4 mm až 6 mm. Lázeň se zahřeje na teplotu asi o 10 °C nižší než předpokládaná teplota tání a pak se nastaví rychlost zahřívání asi na 1 °C/min. Je-li teplota lázně asi 5 °C pod předpokládanou teplotou tání, umístí se kapilára do zařízení. Ve výše popsaném zařízení je kapilára umístěna tak, že její uzavřený konec je u středu rtuťové baňky teploměru a značka ponoru teploměru je při hladině kapaliny lázně. Zaznamená se teplota, při které poslední částice substance přejde do kapalné fáze.

Kalibrace zařízení. Zařízení může být kalibrováno pomocí teplot tání vhodných referenčních látek, jako např. látek doporučených Světovou zdravotnickou organizací.

2.2.15 Teplota tání - metoda otevřené kapiláry

Následující metodou se u určitých látek stanoví teplota zkapalnění, běžně nazývaná teplotou tání.

Používá se skleněných kapilár otevřených na obou koncích, dlouhých asi 80 mm, o vnějším průměru 1,4 mm až 1,5 mm a o vnitřním průměru 1,0 mm až 1,2 mm.

Pro stanovení se použije pět kapilár. Každá se naplní do výše asi 10 mm zkoušenou látkou připravenou předepsaným způsobem. Kapilára se ponechá vhodnou dobu při předepsané teplotě. Potom se jedna kapilára připevní na teploměr dělený po 0,2 °C, aby sloupec zkoušené látky byl těsně u rtuťové nádržky teploměru. Teploměr s kapilárou se umístí v kádince, aby nádržka se rtutí byla ve vzdálenosti 1 cm od dna kádinky. Kádinka se naplní vodou do výše 5 cm. Voda se zahřívá tak, aby její teplota stoupala rychlostí 1 °C/min.

Jako teplota tání se zaznamenává teplota, při níž sloupec látky v kapiláře začne stoupat.

Tento postup se opakuje i s dalšími čtyřmi kapilárami. Výslednou teplotu tání udává průměr všech pěti stanovení.

2.2.16 Teplota tání - stanovení v kovovém bloku

Okamžitá teplota tání se vypočítá podle vzorce:

$$t_t = \frac{t_1 + t_2}{2},$$

v němž značí:

t_1 - první teplotu,

t_2 - druhou teplotu odečtenou za dále popsaných podmínek.

Zařízení. Zařízení se skládá z kovového bloku odolného vůči zkoušeným látkám s dobrou tepelnou vodivostí (např. mosaz) a s velmi hladkou leštěnou vrchní plochou. Blok se rovnoměrně zahřívá jemně regulovatelným plynovým kahanem nebo pomocí elektrického ohřevu s jemnou regulací. V bloku je válcovitá dutina dostatečně široká pro vložení teploměru, jehož rtuťový sloupec by měl být ve stejné poloze při kalibraci přístroje i stanovení teploty tání zkoušené látky. Válcovitá dutina je rovnoběžná s horním hladkým povrchem bloku ve vzdálenosti asi 3 mm. Přístroj se kalibruje za použití vhodných látek o známé teplotě tání.

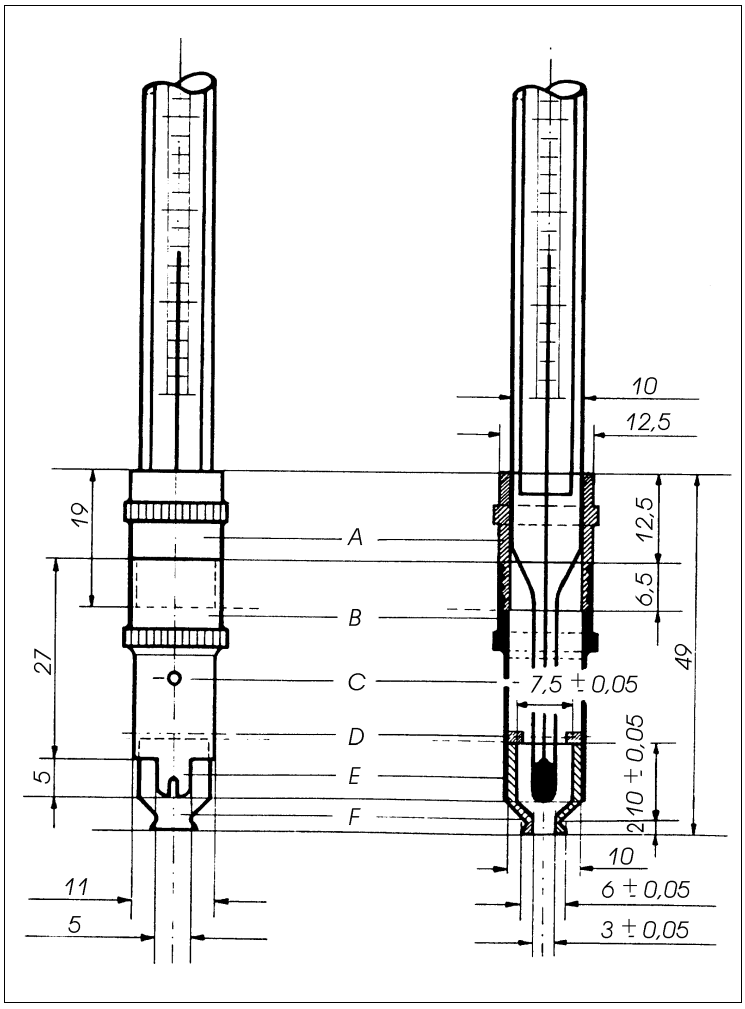
Postup stanovení. Blok se zahřeje vhodnou rychlostí na teplotu asi 10 °C pod očekávanou teplotou tání, potom se nastaví rychlost zahřívání asi na 1 °C/min. V pravidelných intervalech se vkládá několik částeček upráškované zkoušené látky, pokud je třeba i vysušené za podmínek uvedených u kapilární metody, na blok v sousedství rtuťové nádržky teploměru. Po každém stanovení se povrch bloku očistí. Zaznamená se teplota t_1, při které látka taje ihned při prvním kontaktu s povrchem bloku. Další zahřívání bloku se zastaví. Během ochlazování se vkládá opět v pravidelných intervalech několik částeček látky na blok. Povrch bloku se opět očistí po každém stanovení. Zaznamená se teplota t_2, při níž zkoušená látka v kontaktu s blokem přestává okamžitě tát.

Kalibrace přístroje. Přístroj se kalibruje s použitím vhodných referenčních látek pro teplotu tání, např. doporučených látek WHO.

2.2.17 Teplota skápnutí

Teplota skápnutí je teplota, při níž skápne první kapka zkoumaného léčiva z nádobky za definovaných podmínek.

Zařízení. Zařízení (viz obr. 2.2.17-1) se skládá ze dvou navzájem sešroubovaných kovových pouzder (A) a (B). V pouzdru (A) je upevněn rtuťový teploměr. Kovová nádobka tvaru pohárku (F) je prostřednictvím dvou upínacích pásků (E) volně připevněna ke spodní části pouzdra (B). Pevné podpěry (D) délky 2 mm zaručují přesnou polohu nádobky a jsou současně využity pro zajištění správné polohy teploměru. Otvor (C) ve stěně pouzdra (B) slouží k vyrovnávání tlaku. Nádobka má hladký povrch a hrany výtokového ústí svírají se stěnou nádobky pravý úhel. Spodní část rtuťového teploměru má tvar a velikost odpovídající obrázku. Dělení teploměru je od 0 °C do 110 °C, kde vzdálenost 1 mm odpovídá 1 °C. Rtuťová nádržka teploměru má průměr (3,5 ± 0,2) mm a výšku (6,0 ± 3) mm. Zařízení je umístěno v ose zkumavky dlouhé asi 200 mm a vnějšího průměru asi 40 mm a upevněno ve zkumavce pomocí zátky, kterou prochází teploměr a jež je opatřena boční drážkou. Otvor nádobky má být ve vzdálenosti asi 15 mm ode dna zkumavky. Celé zařízení



Obr. 2.2.17-1 Zařízení pro stanovení teploty skápnutí
Rozměry v milimetrech

je ponořeno do kádinky o objemu asi 1 litru naplněné vodou. Dno zkumavky by mělo být asi 25 mm ode dna kádinky. Hladina vody by měla dosahovat k horní části pouzdra (A). K zabezpečení stejné teploty vody se použije míchadlo.

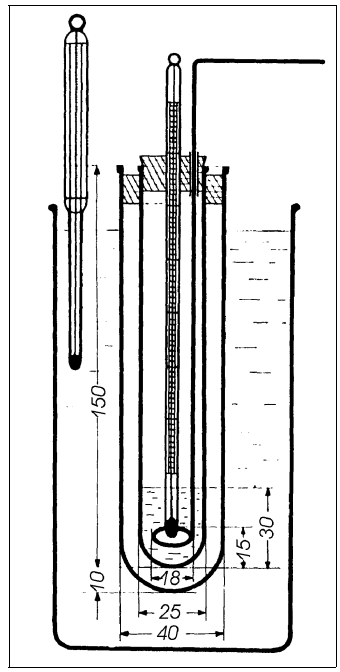
Postup stanovení. Pokud není uvedeno jinak, naplní se nádobka až po okraj zkoumanou látkou, aniž by se látka zahřívala. Pomocí kopistky se odstraní přebytek léčiva na okrajích nádobky. Po sešroubování pouzder (A) a (B) se nádobka zatlačí do krytu v pouzdře (B) až k pevné podpěře (D). Přebytečné léčivo vytlačené teploměrem se opět odstraní kopistkou. Zařízení se umístí do vodní lázně, jak bylo popsáno výše. Vodní lázeň se zahřívá, a když je teplota asi 10 °C pod očekávanou teplotou skápnutí, nastaví se rychlost zahřívání asi na 1 °C/min. Zaznamená se teplota, při níž skápne první kapka. Měření se provede třikrát vždy s novým vzorkem léčiva. Rozdíl mezi jednotlivými hodnotami stanovení nesmí být výšší než 3 °C. Teplota skápnutí léčiva je aritmetický průměr ze tří stanovení.

2.2.18 Teplota tuhnutí

Teplota tuhnutí je nejvyšší teplota naměřená během tuhnutí podchlazené kapaliny.

Přístroj. Přístroj, viz obr. 2.2.18-1, se skládá ze zkumavky asi o průměru 25 mm a délce 150 mm umístěné uvnitř jiné zkumavky asi o průměru 40 mm a délce 160 mm. Vnitřní zkumavka je uzavřena zátkou, kterou prochází teploměr asi 175 mm dlouhý se stupnicí dělenou po 0,2 °C. Teploměr je upevněn tak, aby jeho spodní část (baňka se rtutí) byla asi 15 mm ode dna zkumavky. Zátka má další otvor, kterým prochází držadlo míchadla, vyrobeného ze skleněné tyčinky nebo jiného vhodného materiálu, vytvarované na jednom konci v pravém úhlu k tyčince do smyčky o vnějším průměru asi 18 mm. Vnitřní zkumavka se svým obalem je umístěna uprostřed kádinky o obsahu 1 l naplněné 20 mm od horního okraje vhodnou chladicí kapalinou. Do chladicí lázně je umístěn teploměr.

Postup. Do vnitřní zkumavky se vpraví dostatečné množství kapaliny nebo předem roztavené zkoušené látky tak, aby byla ponořena celá baňka teploměru, a rychlým ochlazením se stanoví přibližná teplota tuhnutí. Vnitřní zkumavka se přemístí do lázně asi o 5 °C teplejší než přibližná teplota tuhnutí a ponechá se v ní, dokud se všechna látka až na několik posledních krystalků neroztaví. Kádinka se naplní vodou nebo nasyceným roztokem chloridu sodného o teplotě asi o 5 °C nižší než předpokládaná teplota tuhnutí. Vnitřní zkumavka se zasune do vnější, ověří se přítomnost ponechaných zárodečných krystalů a důkladně se míchá, až nastane tuhnutí. Zaznamená se nejvyšší teplota pozorovaná během tuhnutí.



Obr. 2.2.18-1 Přístroj na stanovení teploty tuhnutí
Rozměry v milimetrech

2.2.19 Ampérometrické titrace

Při ampérometrických titracích se bod ekvivalence stanoví měřením změny proudu mezi dvěma elektrodami (indikační elektrodou a srovnávací elektrodou nebo dvěma indikačními elektrodami) ponořenými ve zkoušeném roztoku a udržovanými při konstantním rozdílu napětí v závislosti na množství přidaného odměrného roztoku.

Potenciál indikační elektrody má být dostatečný k dosažení limitního proudu elektrochemicky aktivní látky.

Přístroj. Přístoj má regulovatelný zdroj napětí a citlivý mikroampérmetr. Měřicí systém obvykle sestává z indikační elektrody (např. platinové, rtuťové kapkové, rotující diskové nebo uhlíkové elektrody) a srovnávací elektrody (např. kalomelové nebo argentchloridové elektrody).

Může být také použito zařízení se třemi elektrodami, které obsahuje kromě indikační a srovnávací elektrody též polarizovatelnou pomocnou elektrodu.

Postup. Potenciál indikační elektrody se nastaví na předepsanou hodnotu a vynese se do grafu závislost počátečního proudu a proudu získaného během titrace na množství přidávaného odměrného roztoku. Odměrný roztok se přidá v minimálně třech následných množstvích, jejichž celkový objem se rovná asi 80 % teoretického objemu odpovídajícího předpokládanému bodu ekvivalence. Tyto tři hodnoty mají ležet na přímce. Odměrný roztok se přidává dále za předpoklá-

daný bod ekvivalence v minimálně třech dalších množstvích. Získané hodnoty rovněž mají ležet na přímce. Bod ekvivalence se nachází na průsečíku obou přímek.

V případě amperometrické titrace se dvěma indikačními elektrodami se zaregistruje celá titrační křivka a použije se ke zjištění bodu ekvivalence.

2.2.20 Potenciometrické titrace

Při potenciometrických titracích se bod ekvivalence stanoví měřením změn rozdílu potenciálů mezi dvěma elektrodami (indikační elektrodou a srovnávací elektrodou nebo dvěma indikačními elektrodami) ponořenými do titrovaného roztoku v závislosti na množství přidávaného odměrného roztoku.

Měření potenciálu se obvykle provádí za nulového nebo prakticky nulového proudu.

Přístroj. Přístroj (jednoduchý potenciometr nebo elektronické zařízení) obsahuje voltmetr, který umožňuje přesnost odečtu nejméně na 1 mV.

Použitá indikační elektroda závisí na stanovované látce; může to být skleněná elektroda nebo kovová elektroda (platinová, zlatá, stříbrná, rtuťová atd.). Srovnávací elektrodou je obvykle kalomelová nebo argentchloridová elektroda.

Při acidobazických titracích, pokud není uvedeno jinak, se použijí kombinace skleněná - kalomelová elektroda nebo skleněná - argentchloridová elektroda.

Postup. Do grafu se vynesou změny rozdílu potenciálů v závislosti na přidaném množství odměrného roztoku, přičemž se pokračuje v přidávání odměrného roztoku až za očekávaný bod ekvivalence. Bod ekvivalence odpovídá náhlé změně rozdílu potenciálů.

2.2.21 Fluorimetrie

Fluorimetrie je metoda, které se používá k měření intenzity fluorescenčního záření emitovaného zkoušenou látkou ve vztahu k intenzitě fluorescenčního záření standardu.

Pracovní postup. Zkoušená látka se rozpustí v rozpouštědle nebo ve směsi rozpouštědel udaných v článku, roztok se přenese do kyvety nebo fluorimetrické trubice (průtokové kyvety) a osvětlí se excitačním, co nejvíce monochromatickým světlem o vlnové délce předepsané v článku.

Měří se intenzita emitovaného záření v úhlu 90° vzhledem k excitačnímu paprsku po průchodu filtrem, který propouští zejména záření při vlnové délce fluorescence. Může být použit také jiný typ zařízení, pokud je zajištěno, že získané výsledky jsou identické.

Pro stanovení se nejprve umístí do přístroje rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel použitých k rozpouštění stanovované látky a přístroj se nastaví na nulu. Vloží se roztok standardu a nastaví citlivost přístroje tak, aby odečtená hodnota byla větší než 50. Při změně šířky štěrbiny je třeba znovu nastavit nulu a měřit intenzitu fluorescence standardu. Nakonec se vloží roztok neznámé koncentrace a odečte se na přístroji intenzita fluorescence. Koncentrace c_x zkoušené látky v měřeném roztoku se vypočítá ze vztahu:

$$c_x = \frac{I_x \, c_s}{I_s},$$

v němž značí:

c_s - koncentraci roztoku standardu,

I_x - intenzitu fluorescence emitované roztokem zkoušené látky,

I_s - intenzitu fluorescence emitované roztokem standardu.

Pokud intenzita fluorescence není přímo úměrná koncentraci, je vhodnější použít pro měření kalibrační křivku. V některých případech může být měření provedeno vzhledem k pevnému standardu (např. fluorescenčnímu sklu nebo roztoku jiné fluorescenční látky). V takových případech se koncentrace zkoušené látky stanoví s použitím předem sestrojené kalibrační křivky za stejných podmínek.

2.2.22 Atomová emisní spektrometrie

Atomová emisní spektrometrie je metoda na stanovení koncentrace prvku v látce měřením intenzity jedné z emisních čar atomové páry prvku generované z látky. Stanovení se provádí při vlnové délce odpovídající této emisní čáře.

Přístroj. Skládá se hlavně z atomizátoru stanovovaného prvku (plamen, plazma, oblouk atd.), monochromátoru a detektoru. Pokud je atomizátorem plamen, je vhodné použít *vodu R* jako rozpouštědlo na přípravu zkoušených a porovnávacích roztoků. Také lze použít organická rozpouštědla, zjistí-li se, že rozpouštědlo nebude ovlivňovat stabilitu plamene.

Pracovní postup. Atomový emisní spektrometr se obsluhuje ve shodě s výrobními předpisy při předepsané vlnové délce. Roztok slepé zkoušky se aplikuje do atomizátoru a signál přístroje se nastaví na nulu. Vnese se nejkoncentrovanější porovnávací roztok a citlivost se nastaví tak, aby se získal vhodný signál.

Stanovení se provádějí porovnáváním s porovnávacími roztoky o známých koncentracích stanovovaného prvku buď metodou přímé kalibrace (Metoda I), nebo metodou standardních přídavků (Metoda II).

Metoda I - Přímá kalibrace

Připraví se roztok analyzované látky (zkoušený roztok), jak je předepsáno, a nejméně tři porovnávací roztoky stanovovaného prvku, jejichž koncentrace zahrnují očekávanou hodnotu ve zkoušeném roztoku. Zkoumadla používaná k přípravě zkoušeného roztoku se přidávají k porovnávacím roztokům ve stejné koncentraci.

Zkoušený roztok a každý porovnávací roztok se vnese do přístroje nejméně třikrát a zaznamená se ustálený signál. Po každém stanovení se přístroj propláchne roztokem slepé zkoušky a zjistí se, zda se signál vrátí k počáteční hodnotě slepé zkoušky.

Sestrojí se kalibrační křivka z průměru signálů získaných z porovnávacích roztoků a z takto získané křivky se zjistí koncentrace prvku ve zkoušeném roztoku.

Metoda II - Standardní přídavky

Do nejméně třech stejných odměrných baněk se přidají stejné objemy roztoků analyzované látky (zkoušený roztok) připravené, jak je předepsáno. Do každé baňky kromě jedné se přidá postupně zvětšující se objem porovnávacího roztoku obsahujícího známou koncentraci stanovovaného prvku, aby se zhotovila série roztoků obsahujících stále stoupající koncentrace známého prvku, které dají odezvy v lineární části křivky. Obsah každé baňky se zředí rozpouštědlem a doplní po značku.

Každý z roztoků se vnese do přístroje nejméně třikrát a zaznamená se ustálený signál. Po každém stanovení se přístroj propláchne rozpouštědlem a zjistí se, zda se signál vrátí k počáteční hodnotě slepé zkoušky.

Vypočítá se lineární rovnice grafu použitím metody nejmenších čtverců a z toho se odvodí koncentrace stanovovaného prvku ve zkoušeném roztoku.

Alternativně se vynese do grafu průměr signálů proti přidanému množství stanovovaného prvku. Extrapoluje se čára spojující body na grafu do přetnutí osy koncentrace. Vzdálenost mezi tímto bodem a průsečíkem os představuje koncentraci stanovovaného prvku ve zkoušeném roztoku.

Pokud je požadována technika pevného vzorku,podrobné detaily postupu jsou uvedeny v článku.

2.2.23 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie je metoda na stanovení koncentrace prvku v látce měřením absorpce záření atomovými parami prvku generovanými z látky. Stanovení se provádí při vlnové délce jedné z absorpčních čar stanovovaného prvku.

Přístroj. Skládá se ze zdroje záření, atomizátoru stanovovaného prvku (plamen, pícka atd.), monochromátoru a detektoru.

Způsob zavádění analyzované látky závisí na typu používaného atomizátoru. Pokud je to plamen, látka se zmlžuje a *voda R* je vhodné rozpouštědlo na přípravu zkoušených a porovnávacích roztoků. Organická rozpouštědla se též mohou použít, pokud je splněna podmínka, že rozpouštědlo neovlivňuje stabilitu plamene. Jestliže se použije pícka, látky mohou být navážené a rozpuštěné ve *vodě R* nebo v organickém rozpouštědle, ale s touto technikou je možné analyzovat též přímo pevné vzorky.

Atomová pára může být též generovaná mimo spektrometr, např. metoda studených par pro rtuť nebo určité hydridy. U rtuti jsou atomy generované chemickou redukcí a vzniklé atomové páry jsou transportovány proudem inertního plynu do absorpční kyvety instalované v optické dráze přístroje. Hydridy jsou buď míseny s plynem napájejícím hořák, nebo jsou transportovány inertním plynem do vyhřívané kyvety, v níž jsou disociovány na atomy.

Pracovní postup. Atomový absorpční spektrometr se obsluhuje ve shodě s předpisy výrobce při nastavené vlnové délce. Roztok slepé zkoušky se aplikuje do atomizátoru a signál přístroje se nastaví tak, že ukazuje maximum propustnosti. Vnese se nejkoncentrovanější porovnávací roztok a citlivost se nastaví tak, aby se získal vhodný signál absorbance. Stanovení se provádí porovnáním s porovnávacími roztoky známých koncentrací stanovovaného prvku buď metodou přímé kalibrace (Metoda I), nebo metodou standardních přídavků (Metoda II).

Metoda I - Přímá kalibrace

Připraví se roztok analyzované látky (zkoušený roztok), jak je předepsáno, a nejméně tři porovnávací roztoky stanovovaného prvku, jejichž koncentrace zahrnují očekávanou hodnotu ve zkoušeném roztoku. Zkoumadla používaná k přípravě zkoušeného roztoku se přidávají k porovnávacím roztokům a použijí se i při slepé zkoušce ve stejné koncentraci.

Zkoušený roztok a každý porovnávací roztok se vnese do přístroje nejméně třikrát a zaznamená se ustálený signál. Přístroj se vždy propláchne roztokem slepé zkoušky a zjistí se, zda se signál vrátí k počáteční hodnotě slepé zkoušky.

Použije-li se pícky, mezi měřením signálů se vypaluje.

Sestrojí se kalibrační křivka z průměru signálů získaných porovnávacích roztoků a ze získané křivky se vypočte koncentrace stanovovaného prvku ve zkoušeném roztoku.

Pokud je požadována technika pevného vzorku, podrobné detaily postupu jsou uvedeny v článku.

Metoda II - Standardní přídavky

Do nejméně tří stejných odměrných baněk se přidají stejné objemy roztoku analyzované látky (zkoušený roztok) připravené, jak je předepsáno. Do každé baňky kromě jedné se přidá postupně zvětšující se objem porovnávacího roztoku obsahujícího známou koncentraci stanovovaného prvku, aby se připravila série roztoků obsahujících stoupající koncentraci známého prvku, které dají odezvu v lineární části křivky. Obsah každé baňky se zředí rozpouštědlem a doplní se jím po značku. Každý z roztoků se vnese do přístroje nejméně třikrát a zaznamená se ustálený signál. Pokaždé se přístroj propláchne rozpouštědlem a zjistí se, zda se signál vrátí k počáteční hodnotě slepé zkoušky.

Použije-li se pícka, mezi měřením signálů se vypaluje.

Vypočítá se lineární rovnice grafu použitím metody nejmenších čtverců a z toho se odvodí koncentrace stanovovaného prvku ve zkoušeném roztoku.

Alternativně se vynese do grafu průměr signálů proti přidanému množství stanovovaného prvku. Extrapoluje se čára spojující body na grafu do přetnutí osy koncentrace. Vzdálenost mezi tímto bodem a průsečíkem os udává koncentraci stanovovaného prvku ve zkoušeném roztoku.

Pokud je požadována technika pevného vzorku, všechny podrobnosti postupu jsou uvedeny v článku.

2.2.24 Absorpční spektrofotometrie v infračervené oblasti

Spektrofotometry pro záznam spekter v infračervené oblasti mají optický systém schopný dávat monochromatické záření v oblasti od 4000 cm^{-1} do 670 cm^{-1} (2,5 μm až 15 μm) nebo v některých případech až do 200 cm^{-1} (50 μm) a zařízení pro měření poměru intenzity transmitovaného a dopadajícího záření.

Příprava vzorku

Pro záznam pomocí transmitance

Látka se upraví jedním z následujících postupů.

Kapaliny

Kapalina se zkouší buď jako film mezi dvěma destičkami transparentními pro infračervené záření, nebo v kyvetě vhodné tloušťky rovněž transparentní pro infračervené záření.

Kapaliny nebo pevné látky v roztoku

Připraví se roztok ve vhodném rozpouštědle. Zvolí se koncentrace a tloušťka kyvety tak, aby se získalo vhodné spektrum. Dobré výsledky se zpravidla získají s koncentracemi od 10 g/l do 100 g/l pro tloušťku kyvety 0,5 mm až 0,1 mm. Absorpce způsobená rozpouštědlem by měla být kompenzována vložením podobné kyvety s použitým rozpouštědlem do referenčního paprsku.

Pevné látky

Pevné látky se zkoušejí dispergované ve vhodné kapalině (suspenze) nebo v pevné látce (halogenidová tableta) podle toho, co je vhodnější. Je-li to v článku předepsáno, připraví se film z taveniny mezi dvěma destičkami transparentními pro infračervené záření.

a) *Suspenze.* Rozetře se malé množství zkoušené látky s minimálním množstvím *tekutého parafinu R* nebo jiné vhodné kapaliny; k přípravě vhodné suspenze stačí zpravidla 5 mg až 10 mg zkoušené látky. Suspenze se stlačí mezi dvě destičky transparentní pro infračervené záření.

b) *Tableta.* Není-li uvedeno jinak, rozetřou se 1 mg až 2 mg zkoušené látky s 300 mg až 400 mg jemně práškovaného a vysušeného *bromidu draselného R* nebo *chloridu draselného R.* Tato množství postačují zpravidla k přípravě tablety o průměru 13 mm a k získání spektra vhodné intenzity. Směs se pečlivě rozetře, stejnoměrně se jí naplní vhodná forma a slisuje se ve vakuu tlakem asi 800 MPa (8 $t.cm^{-2}$). Z různých příčin mohou vzniknout špatné tablety: např. nedostatečné nebo přílišné roztírání, vlhkost nebo jiné nečistoty v dispergujícím prostředí a nedostatečné rozmělnění částeček. Tableta se nepoužije, vykazuje-li při vizuální kontrole nejednotnou transparentnost nebo je-li transmitance při asi 2000 cm^{-1} (5 μm) a nepřítomnosti specifického absorpčního pásu menší než 75 % bez kompenzace.

Plyny

Plyny se zkoušejí v kyvetě transparentní pro infračervené záření mající optickou tloušťku asi 100 mm. Kyveta se evakuuje a naplní se na požadovaný tlak pomocí kohoutu nebo jehlového ventilu při použití vhodné trubice pro převod plynu mezi kyvetou a nádobou obsahující zkoušenou látku. Je-li to nutné, upraví se tlak v kyvetě na tlak atmosférický použitím plynu transparentního pro infračervené záření (např. *dusíku R* nebo *argonu R*). K odstranění interference absorpce způsobené

vodou, oxidem uhličitým nebo jinými atmosférickými plyny se vloží do referenčního paprsku stejná kyveta, která je buď evakuována, nebo naplněna plynem transparentním pro infračervené záření.

Pro záznam pomocí mnohonásobné reflexe

Je-li tento záznam předepsán v článku, upraví se látka jednou z následujících metod.

Roztoky

Látka se rozpustí ve vhodném rozpouštědle za podmínek uvedených v článku. Roztok se odpaří na thaliumbromido-jodidové destičce nebo na jiné vhodné destičce.

Pevné látky

Látka se homogenně rozprostře na thaliumbromido-jodidové nebo jiné vhodné destičce.

Identifikace s použitím referenčních látek

Stejným způsobem se upraví jak zkoušená, tak i referenční látka a za stejných podmínek se zaznamenají spektra od 4000 cm^{-1} do 670 cm^{-1} (2,5 μm až 15 μm). Absorpční maxima spektra zkoušené látky odpovídají polohou i relativní intenzitou hodnotám referenční látky (CRL).

Vykazují-li spektra zaznamenaná v pevném stavu rozdíly v polohách absorpčních maxim, zpracuje se stejným způsobem zkoušená i referenční látka tak, aby vykrystalizovaly nebo vznikly ve stejné formě, nebo se postupuje tak, jak je předepsáno v článku, a pak se zaznamenají spektra.

Identifikace s použitím referenčních spekter

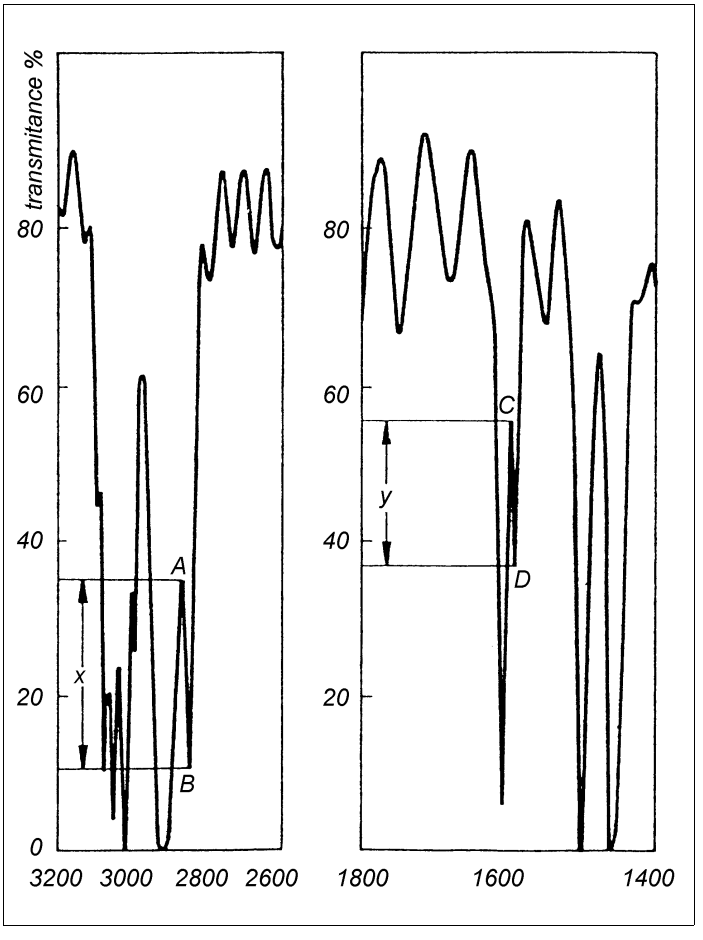
Kontrola rozlišovací schopnosti. Zaznamená se spektrum 0,05 mm silného polystyrenového filmu. Rozdíl *x* (viz obr. 2.2.24-1) mezi procenty transmitance v absorpčním minimu A při 2870 cm^{-1} (3,48 μm) a absorpčním maximu B v 2851 cm^{-1}(3,51 μm) by měl být větší než 18. Rozdíl *y* mezi procenty transmitance v absorpčním minimu C při 1589 cm^{-1} (6,29 μm) a absorpčním maximu D při 1583 cm^{-1} (6,32 μm) by měl být větší než 12.

Ověření stupnice vlnočtů. Stupnice vlnočtů může být ověřena použitím polystyrenového filmu, který má maxima při vlnočtech v cm^{-1} uvedených v tab. 2.2.24-1. Čísla v závorkách znamenají přesnost, s níž byly hodnoty stanoveny.

Tab. 2.2.24-1 Absorpční maxima polystyrenového filmu

3027,1 (±0,3)	1583,1 (±0,3)
2924,0 (±2)	1181,4 (±0,3)
2850,7 (±0,3)	1154,3 (±0,3)
1944,0 (±1)	1069,1 (±0,3)
1871,0 (±0,3)	1028,0 (±0,3)
1801,6 (±0,3)	906,7 (±0,3)
1601,4 (±0,3)	698,9 (±0,5)

Pracovní postup. Zkoušená látka se připraví podle návodu uvedeného u referenčního spektra. Za pracovních podmínek, které byly použity při kontrole rozlišovací schopnosti, se zaznamená spektrum zkoušené látky a na něj se superponují absorpční pásy polystyrenu při 2851 cm^{-1} (3,51 μm), 1601 cm^{-1} (6,25 μm) a 1028 cm^{-1} (9,73 μm). Porovnají se obě spektra a maxima polystyrenu uvedená výše. Použijeme-li poloh maxim polystyrenu jako referenčních údajů, pak polohy význačných maxim spektra zkoušené látky a referenčního spektra by měly odpovídat vlnočtové stupnici (s odchylkou maximálně 0,5 %). Relativní intenzity maxim obou spekter by měly být shodné.



Obr. 2.2.24-1 Typické spektrum polystyrenu používané při kontrole rozlišovací schopnosti

Nečistoty v plynech

Pro analýzu nečistot v plynech se použije kyveta transparentní pro infračervené záření o vhodné optické délce (např. 1 m až 20 m). Naplní se způsobem uvedeným v odstavci "Plyny". Detekce a kvantifikace nečistot se provede podle postupu uvedeného v článku.

2.2.25 Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Stanovení absorbance. Absorbance A roztoku je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance T pro monochromatické světlo a je vyjádřena vztahem:

$$A = \log_{10}(1/T) = \log_{10}(I_0/I) ,$$

v němž značí:
T - I/I_0,
I_0 - intenzitu dopadajícího monochromatického světelného toku,
I - intenzitu prošlého monochromatického světelného toku.

V homogenním prostředí měřená absorbance *(A)* závisí na tloušťce měřené vrstvy *(b)*, kterou světlo prochází, a na koncentraci absorbující látky v roztoku *(c)* podle vztahu:

$$A = \varepsilon \,.\, c \,.\, b \,,$$

v němž značí:

ε - molární absorpční koeficient (molární absorptivita), je-li koncentrace vyjádřena v mol/l (c) a tloušťka vrstvy v cm.

Výraz $A_{1cm}^{1\%}$ je specifická absorbance, která vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 10 g/l měřenou v 1cm vrstvě při určité vlnové délce:

$$A_{1\mathrm{cm}}^{1\%} = \frac{10\varepsilon}{M_{\mathrm{r}}} \,.$$

Není-li uvedeno jinak, měří se absorbance při předepsané vlnové délce v 1cm vrstvě při (20 ± 1) °C a měření se provádí proti použitému rozpouštědlu nebo směsi rozpouštědel. Absorbance použitého rozpouštědla měřená proti vzduchu při předepsané vlnové délce by neměla být vyšší než 0,4, a je přednostně menší než 0,2. Absorpční spektrum se vynese jako závislost absorbance nebo její funkce (osa úseček) na vlnové délce nebo na její funkci (osa pořadnic).

Jestliže je v článcích uváděna jedna hodnota vlnové délky pro maximum absorpce, může se nalezená hodnota od této lišit nejvýše o ±2 nm.

Zařízení. Spektrofotometry vhodné pro měření v ultrafialové a viditelné oblasti spektra se skládají z optického systému schopného poskytovat monochromatické světlo v rozsahu 200 nm až 800 nm a ze zařízení vhodného pro měření absorbance.

Kontrola vlnových délek. Správnost stupnice vlnových délek se ověřuje pomocí hodnot absorpčních maxim roztoku *chloristanu holmitého R*. Poloha čar pro vodíkovou, resp. deuteriovou lampu a poloha čar pro rtuťové páry jsou uvedeny v tab. 2.2.25-1. Povolená tolerance je ±1 nm pro ultrafialovou oblast a ±3 nm pro viditelnou oblast.

Tab. 2.2.25-1 Maxima absorpce roztoku *chloristanu holmitého R* a poloha čar pro vodíkovou a deuteriovou lampu

241,15 nm (Ho)	404,66 nm (Hg)
253,7 nm (Hg)	435,83 nm (Hg)
287,15 nm (Ho)	486,0 nm (Dbeta)
302,25 nm (Hg)	486,1 nm (Hbeta)
313,16 nm (Hg)	536,3 nm (Ho)
334,15 nm (Hg)	546,07 nm (Hg)
361,5 nm (Ho)	576,96 nm (Hg)
365,48 nm (Hg)	579,07 nm (Hg)

Kontrola absorbance. Správnost stupnice absorbancí se ověřuje roztokem *dichromanu draselného R* při vlnových délkách uvedených v tab. 2.2.25-2, v níž jsou pro každou vlnovou délku uvedeny přesné hodnoty specifické absorbance a povolené limity. Tolerance pro absorbanci je ±0,01.

Pro kontrolu absorbance se použije roztoku *dichromanu draselného R* připraveného takto: rozpustí se 57,0 mg až 63,0 mg *dichromanu draselného R*, předtím vysušeného při 130 °C do konstantní hmotnosti, v *kyselině sírové 0,005 mol/l RS* a doplní se jí na 1000,0 ml.

Tab. 2.2.25-2

Vlnová délka v nm	$A^{1\%}_{1cm}$	Maxima tolerance
235	124,5	122,9 až 126,2
257	144,0	142,4 až 145,7
313	48,6	47,0 až 50,3
350	106,6	104,9 až 108,2

Absorbance roztoku dichromanu draselného obsahujícího přesně 60,06 mg $K_2Cr_2O_7$ v 1000,0 ml roztoku *kyseliny sírové 0,005 mol/l RS* byly použity jako základ pro tab. 2.2.25-2. Hodnoty absorbance tohoto roztoku měřené při tloušťce vrstvy 1 cm jsou uvedeny v tab. 2.2.25-3.

Tab. 2.2.25-3

235 nm	0,748
257 nm	0,865
313 nm	0,292
350 nm	0,640

Limit rozptýleného záření může být sledován při daných vlnových délkách pomocí vhodných roztoků nebo filtrů. Např. absorbance roztoku *chloridu draselného R* (12 g/l) měřená v 1cm vrstvě při 200 nm by měla být vyšší než 2 v porovnání s *vodou R* jako kontrolní kapalinou.

Rozlišovací schopnost (pro kvalitativní analýzu). Pokud je to předepsáno v článku, je třeba provést měření rozlišovací schopnosti přístroje takto: zaznamená se spektrum roztoku *toluenu R* (0,02% *V/V*) v *hexanu R*. Minimální poměr absorbance v maximu při 269 nm a absorbance v minimu při 266 nm je uveden v článku.

Spektrální šířka štěrbiny (pro kvantitativní analýzu). Abychom předešli při měření chybám způsobeným spektrální šířkou štěrbiny při použití přístroje, kde šířka štěrbiny při zvolené vlnové délce může být měněna, měla by být šířka štěrbiny malá ve srovnání s pološířkou absorpčního pásu, ale současně by měla být co největší, abychom získali vysokou hodnotu I_0. V každém případě šířka štěrbiny přístroje by měla být vždy taková, aby při jejím dalším zmenšení nedocházelo ke změnám v odečtu absorbance.

Kyvety. Povolená tolerance vnitřní vzdálenosti protilehlých stěn používaných kyvet je ±0,005 cm. Naplní-li se týmž rozpouštědlem, měly by kyvety pro zkoušený roztok a pro porovnávací kapalinu mít stejnou transmitanci. V opačném případě je třeba zavést příslušnou korekci.

Kyvety je nutno čistit a zacházet s nimi opatrně.

2.2.26 Papírová chromatografie

Vzestupná papírová chromatografie

Zařízení. Zařízení se skládá ze skleněné komory vhodných rozměrů pro použitý chromatografický papír. Horní část komory je zabroušená a opatřená dobře těsnícím víkem. V horní části komory je zařízení umožňující zavěšení chromatografického papíru a jeho ponoření do mobilní fáze bez otevření komory. Na dně komory je umístěna miska obsahující mobilní fázi, do které může být papír ponořen. Jako chromatografický papír se použije vhodný filtrační papír nastříhaný do pruhů dostatečné délky, ne užších než 2,5 cm; papír je nastříhán tak, aby mobilní fáze protékala ve směru vláken papíru.

Pracovní postup. Mobilní fáze, která je předepsána v článku, se nalije do misky na dně komory do výšky 2,5 cm. Pokud je uvedeno v článku, nalije se stacionární fáze i mezi stěny komory a misku. Komora se uzavře a ponechá se stát po dobu 24 h při teplotě 20 °C až 25 °C. V uvedeném intervalu teplot se komora udržuje i v průběhu další analýzy. Na papír se vyznačí měkkou tužkou horizontální linie (start) ve vzdálenosti 3 cm od jednoho konce. Mikropipetou se nanese na start ve formě skvrny objem roztoku, který je uveden v článku. Jestliže celkový objem nanášeného roztoku by vytvořil skvrnu o větším průměru než 10 mm, roztok se nanáší po částech v opakovaných dílčích dávkách tak, aby se před každým dalším nanášením rozpouštědlo odpařilo. Chromatografuje-li se na stejném pruhu papíru více než jeden vzorek, vzdálenost mezi sousedními skvrnami na startu nemá být menší než 3 cm. Papír s naneseným vzorkem se vloží do komory, která se uzavře víkem, a ponechá stát 1 h 30 min. Potom se papír ponoří do mobilní fáze a vyvíjí se do předepsané vzdálenosti nebo po předepsanou dobu. Papír se vyjme a ponechá uschnout na vzduchu. Během vyvíjení se papír chrání před přímým světlem.

Sestupná papírová chromatografie

Zařízení. Zařízení se skládá ze skleněné komory vhodných rozměrů pro použitý chromatografický papír. Horní část komory je zabroušená a opatřená dobře těsnícím víkem. Víko má středový otvor o průměru asi 1,5 cm uzavíratelný těžkou skleněnou deskou nebo zátkou. V horní části komory je umístěn žlábek pro rozpouštědlo se zařízením k zavěšení chromatografického papíru. Na každé straně žlábku jsou paralelně nad jeho horními okraji umístěny dvě skleněné vodicí tyče podpírající papír tak, aby žádná jeho část se nedotýkala stěn komory. Chromatografický papír je tvořen vhodným filtračním papírem nastříhaným na pruhy dostatečné délky a vhodné šíře, tj. mezi 2,5 cm a délkou žlábku; papír je nastříhán tak, aby mobilní fáze protékala ve směru vláken papíru.

Pracovní postup. Na dno komory se nalije rozpouštědlo uvedené v článku do výše 2,5 cm. Komora se uzavře a ponechá stát 24 h při teplotě 20 °C až 25 °C. V tomto rozmezí teplot se komora v průběhu analýzy udržuje. Na papír se vyznačí měkkou tužkou horizontální linie (start) v takové vzdálenosti od jednoho konce, aby po zajištění tohoto konce papíru ve žlábku s rozpouštědlem zbytek papíru volně splýval přes vodicí tyč a start byl několik cm pod vodicí tyčí a paralelně s ní. Pomocí mikropipety se nanese na start objem roztoku, který je uveden v článku. Jestliže celkový objem, který je nutno nanést, by vytvořil skvrnu o větším průměru než 10 mm, je nutno nanášet roztok po částech tak, aby se před každým následujícím nanášením rozpouštědlo odpařilo. Chromatografuje-li se na tomtéž pruhu papíru více než jeden vzorek, pak vzdálenost mezi sousedními skvrnami nemá být menší než 3 cm. Papír s naneseným vzorkem se vloží do komory, která se uzavře víkem, a ponechá se stát 1 h 30 min. Do žlábku se otvorem ve víku vpraví dostatečné množství mobilní fáze, komora se uzavře a papír se vyvíjí do předepsané vzdálenosti nebo po předepsanou dobu. Papír se vyjme z komory a ponechá uschnout na vzduchu. Během vyvíjení se papír chrání před přímým světlem.

2.2.27 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je separační metoda, u které stacionární fázi tvoří vhodný materiál nanesený v rovnoměrné tenké vrstvě a fixovaný na skleněný, kovový nebo plastický podklad (deska nebo fólie). K separaci dochází migrací rozpuštěných látek tenkou vrstvou v rozpouštědle nebo vhodné směsi rozpouštědel (mobilní fáze).

Pokud není uvedeno jinak, použije se následující zařízení, desky a postup.

Zařízení

Zařízení se skládá:

- z desek nebo fólií s vrstvami hotovými nebo připravenými (jak je popsáno níže) vhodné velikosti (obvykle 100 mm x 100 mm nebo 200 mm x 200 mm) pro nanášení chromatografovaných roztoků a vyvíjení do předepsané vzdálenosti (dráhy). Tloušťka vrstvy je obvykle 0,1 mm až 0,3 mm,
- z chromatografické komory s plochým nebo dvojžlábkovým dnem z inertního transparentního materiálu vhodné velikosti pro použité desky nebo fólie a opatřené dobře těsnícím víkem,
- z mikropipet, mikroinjekčních stříkaček, kalibrovaných kapilár pro jedno použití nebo jiného nanášecího zařízení, které je vhodné pro správné nanášení roztoků.

Desky

Chromatografie se provádí s použitím desek s vrstvami hotovými nebo připravenými, jak je popsáno níže. Oba typy vrstev vyhovují požadavku ověření detekční schopnosti, je-li předepsáno, i požadavku ověření separační schopnosti. Tyto zkoušky se provádějí současně s chromatografií zkoušené látky nanesením předepsaných porovnávacích roztoků. Je-li nutné, vrstvy je možno před použitím aktivovat zahřátím při 100 °C až 105 °C po dobu 1 h.

Příprava vrstev

Připraví se homogenní suspenze stacionární fáze a vhodným zařízením se nanese na pečlivě vyčištěné desky vrstva o síle 0,1 mm až 0,3 mm. Desky s vrstvami se ponechají schnout na vzduchu a potom se zahřívají v sušárně při teplotě 100 °C až 105 °C po dobu 1 h. Před použitím desky se odstraní úzký pruh vrstvy stacionární fáze z obou stran desky, aby tyto pruhy byly v průběhu vyvíjení vertikálně.

Pracovní postup

Stěny chromatografické komory se vyloží filtračním papírem. Do chromatografické komory se podle její velikosti nalije takové množství mobilní fáze, aby po impregnaci filtračního papíru byla na dně komory vrstva mobilní fáze o výšce 5 mm až 10 mm. Komora se uzavře víkem a ponechá se stát při 20 °C až 25 °C po dobu 1 h.

Na vrstvu se nanese ve vzdálenosti asi 15 mm až 20 mm od spodního okraje a nejméně 10 mm od bočního okraje předepsaný objem roztoků v dostatečně malých dávkách, aby vznikly kruhové skvrny (o průměru 2 mm až 6 mm) nebo, je-li předepsáno, skvrny tvaru proužků (10 mm až 20 mm x 2 mm až 6 mm). Roztoky se nanášejí na start paralelně se spodním okrajem desky tak, aby vzdálenost mezi skvrnami byla nejméně 10 mm.

Po odpaření rozpouštědla z nanášených roztoků se deska vloží do chromatografické komory tak, aby byla co nejvíce ve vertikální poloze a skvrny byly nad hladinou mobilní fáze. Chromatografická komora se uzavře a udržuje při teplotě 20 °C až 25 °C. Deska se vyjme z komory, když mobilní fáze dosáhne vzdálenosti předepsané v článku, vysuší se a chromatogram se deteguje předepsaným způsobem.

Pro dvojrozměrnou chromatografii se vrstva po prvním vyvíjení vysuší a provede se druhé vyvíjení ve směru kolmém na směr prvního vyvíjení.

Ověření separační schopnosti

Požadavky na ověření separační schopnosti jsou uvedeny v příslušných článcích.

Ověření detekční schopnosti

Detekční schopnost je dostatečná, jsou-li skvrny získané na chromatogramu s nejzředěnějším porovnávacím roztokem jasně viditelné.

2.2.28 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, ve které mobilní fází je plyn (nosný plyn) a stacionární fází naplněnou do kolony je buď pevná látka, nebo kapalina, kterou je pokryt pevný inertní nosič, nebo kapalný film rovnoměrně nanesený na stěnách kolony.

Plynová chromatografie je založena na mechanismu adsorpce a/nebo rozdělování.

Přístroj. Přístroj se skládá ze zdroje plynu, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Kolona je obvykle skleněná nebo z nerezové oceli a obsahuje stacionární fázi. Nosný plyn protéká kolonou kontrolovanou rychlostí do detektoru.

Stanovení je prováděno buď při konstantní teplotě, nebo podle daného teplotního programu.

Použitý detektor musí umožňovat stanovení množství sledovaných látek přítomných v eluátu z kolony. Obvykle je založen na principu plamenné ionizace, tepelné vodivosti, tepelné ionizace nebo elektronového záchytu.

Pracovní postup. Kolona, dávkovací zařízení a detektor se stabilizují při předepsaných teplotách. Připraví se roztok zkoušené látky a porovnávací roztok nebo roztoky, jak je předepsáno. Použitím porovnávacích roztoků se určí vhodné nastavení parametrů přístroje a množství, které má být nastřikováno, aby byla získána vhodná odezva. Provedou se opakované nástřiky, aby byla ověřena reprodukovatelnost odezvy, a je-li zapotřebí, určí se počet teoretických pater.

Nastříknou se roztoky a zaznamenají se výsledné chromatogramy. Provedou se opakované nástřiky, aby byla ověřena reprodukovatelnost odezvy. Určí se plochy píků nebo alternativně výšky píků odpovídajících sledovaným složkám, je-li faktor symetrie píku vypočítán, jak je uvedeno níže, mezi 0,80 a 1,20. Při měřeních vyžadujících teplotní program má být určována plocha píků. Je-li použit vnitřní standard, prověří se, zda žádný pík sledované látky není překryt píkem vnitřního standardu.

Ze získaných hodnot se vypočte obsah stanovované složky nebo složek. Je-li předepsáno, vypočte se procentuální obsah jedné nebo více složek sledované látky určením plochy píku nebo píků z celkové plochy všech píků, vyjma píků rozpouštědla nebo kterýchkoliv přidaných látek (normalizační postup). V tomto případě je doporučeno použití zesilovače se širokým rozsahem a automatického integrátoru.

Faktor symetrie píku se vypočte z výrazu:

$$\frac{b_{0,05}}{2A},$$

v němž značí:

$b_{0,05}$ - šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky,

A - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině výšky píku.

Rozlišení (R_s) se vypočte ze vzorce:

$$R_s = \frac{1{,}18\ (t_{Rb} - t_{Ra})}{b_{0,5a} + b_{0,5b}}\ ,$$

$$t_{Rb} > t_{Ra}$$

v němž značí:

t_{Rb} a t_{Ra} - vzdálenosti podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků (mm),

$b_{0,5a}$ a $b_{0,5b}$ - šířky píků v polovině jejich výšky (mm).

Výsledky stanovení lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi měřenými píky v chromatogramu je větší než 1,0, pokud není předepsáno jinak.

Počet teoretických pater (n) se vypočte z údajů získaných za izotermických podmínek ze vzorce:

$$n = 5{,}54\left(\frac{t_R}{b_{0,5}}\right)^2\ ,$$

v němž značí:

t_R - vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu sledovaného píku (mm),

$b_{0,5}$ - šířku píku v polovině jeho výšky (mm).

Kapacitní poměr (D_m) (známý též jako kapacitní faktor) je definován jako:

$$D_m = \frac{\text{množství rozpuštěných látek ve stacionární fázi}}{\text{množství rozpuštěných látek v mobilní fázi}} = K\,\frac{V_s}{V_m}\ ,$$

v němž značí:

K - rovnovážný rozdělovací koeficient,

V_s - objem stacionární fáze,

V_m - objem mobilní fáze.

Kapacitní poměr složky může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = \frac{t_R - t_{R'}}{t_{R'}}\ ,$$

v němž značí:

t_R - vzdálenost v mm podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku odpovídajícího složce,

$t_{R'}$ - vzdálenost v mm podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

Poměr signálu k šumu (S/N) je počítán ze vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h_n}\ ,$$

v němž značí:

H - výšku píku odpovídajícího dané složce na chromatogramu získaném s předepsaným porovnávacím roztokem,

h_n - absolutní hodnotu největší výchylky signálu šumu od základní linie na chromatogramu kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce a sledovaného v rozsahu úměrném 20násobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku a pozorovaného v místě rovnoměrně situovaném okolo místa, kde by se tento pík nacházel.

Head-space plynová chromatografie

Head-space plynová chromatografie je metoda zvláště vhodná pro rozdělení a stanovení těkavých látek přítomných v pevných nebo kapalných vzorcích. Metoda je založena na analýze plynné fáze, která je v rovnováze s pevnou nebo kapalnou fází.

Přístroj. Přístroj se skládá z plynového chromatografu opatřeného zařízením pro zavádění zkoušeného vzorku, které může být připojeno k modulu, jenž automaticky ovládá tlak a teplotu. Je-li to nutné, může být připojeno zařízení pro eliminaci rozpouštědel. Analyzovaný vzorek je umístěn do lahvičky opatřené vhodným uzávěrem. Další částí je systém ventilů umožňující průchod nosného plynu. Lahvička je umístěna do termostatované nádobky vyhřívané na vhodnou teplotu dle povahy zkoušeného vzorku. Vzorek je zahříván na tuto teplotu dostatečně dlouho, aby byla ustavena rovnováha mezi pevnou nebo kapalnou fází a plynnou fází.

Nosný plyn je zaváděn do nádobky a po předepsaném čase se otevře vhodný ventil, který umožní expanzi plynu unášejícího zplynitelné látky do chromatografické kolony.

Místo chromatografu speciálně vybaveného pro zavádění vzorků je též možné použít vzduchotěsnou stříkačku a běžný chromatograf. Ustavení rovnováhy pak probíhá v oddělené komůrce a plynná fáze je vedena na kolonu při zajištění podmínek zaručujících, že nedojde k porušení rovnováhy.

Pracovní postup. Použitím porovnávacích vzorků se určí vhodné instrumentální podmínky k dosažení vhodné odezvy.

a) Přímá kalibrace

Do stejných lahviček se umístí odděleně zkoušené látky a všechny porovnávací vzorky, jak je předepsáno v článku, přičemž se zabrání kontaktu mezi dávkovacím zařízením a vzorky. Lahvičky se hermeticky uzavřou a vloží do termostatovaného prostoru udržovaného na teplotě a tlaku předepsaných v článku.

Po ustavení rovnováhy se provede chromatografická analýza za předepsaných podmínek.

b) Standardní přídavek

Do sady stejných vhodných lahviček se umístí stejné objemy zkoušeného přípravku. Do všech lahviček kromě jedné se přidají vhodná množství porovnávacích vzorků, které obsahují známé koncentrace stanovované látky, takže vznikne série přípravků obsahujících postupně vzrůstající koncentrace této látky. Lahvičky se hermeticky uzavřou a vloží se do termostatovaného prostoru udržovaného na teplotě a tlaku předepsaných v článku. Po ustavení rovnováhy se provede chromatografická analýza za předepsaných podmínek.

Metodou nejmenších čtverců se vypočítá lineární rovnice přímky a z ní se určí koncentrace stanovované látky ve zkoušeném přípravku.

Alternativně se vynesou do grafu střední hodnoty naměřených dat proti přidaným množstvím stanovované látky. Extrapoluje se přímka vycházející z bodu na grafu k ose koncentrací. Vzdálenost mezi tímto bodem a průsečíkem os představuje koncentraci stanovované látky ve zkoušeném přípravku.

c) Postupný odběr

V případě, že je požadována metoda postupného odběru, je podrobně popsána v článku.

2.2.29 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda, kde mobilní fází je kapalina a stacionární fází naplněnou do kolony je buď jemně rozptýlená pevná látka, nebo kapalina nanesená na pevný nosič, nebo pevný nosič, který je chemicky modifikován navázáním organických skupin.

Kapalinová chromatografie je založena na mechanismu adsorpce, rozdělování, iontové výměny nebo vylučování.

Zařízení. Přístroj se obvykle skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení (injekční stříkačka nebo nastřikovací ventil), chromatografické kolony, detektoru a zapisovače. Mobilní fáze je obvykle přiváděna pod tlakem z jednoho nebo více zásobníků a protéká kolonou konstantní rychlostí a potom detektorem.

Teplota chromatografické kolony je udržována konstantní. Složení předepsané mobilní fáze může být buď konstantní během celého chromatografického procesu (izokratická eluce), nebo se může měnit podle definovaného programu (gradientová eluce).

Použitý detektor umožňuje stanovení množství sledovaných látek eluovaných z kolony. Detekce je obvykle založena na absorpční spektrofotometrii. Diferenční refraktometrie, fluorimetrie; spalovací a elektrochemické metody jsou také používány.

Pracovní postup. Kolona se uvede do rovnovážného stavu s předepsanou mobilní fází. Připraví se roztok zkoušené látky a porovnávací roztok nebo roztoky tak, jak je předepsáno. Roztoky nesmí obsahovat pevné částice. Za použití porovnávacích roztoků se určí vhodné nastavení přístroje a nastřikované množství potřebné pro přiměřenou odezvu. Provedou se opakované nástřiky pro ověření reprodukovatelnosti odezvy, a je-li to požadováno, stanoví se počet teoretických pater.

Nastříknou se roztoky a zaznamenají se výsledné chromatogramy. Provedou se opakované nástřiky k ověření reprodukovatelnosti odezvy. Stanoví se plochy píků sledovaných látek, případně výšky píků, leží-li hodnota faktoru symetrie píku vypočtená podle vzorce uvedeného níže mezi 0,80 a 1,20. V aplikacích vyžadujících gradientovou eluci je třeba použít stanovení ploch píků. Je-li použit vnitřní standard, zkontroluje se, zda není žádný pík zkoušené látky překryt píkem vnitřního standardu.

Ze získaných hodnot se vypočte obsah stanovované složky nebo složek. Je-li požadován procentuální obsah jedné nebo více složek zkoušené látky, vypočte se stanovením plochy píku nebo píků jako procenta celkové plochy všech píků vyjma píků rozpouštědla nebo jakéhokoliv přidaného činidla (metoda normalizace). Pak se doporučuje použití automatického integrátoru a zesilovače s širokým rozsahem.

Faktor symetrie píku se vypočte z výrazu:

$$\frac{b_{0,05}}{2A},$$

v němž značí:

$b_{0,05}$ - šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky (mm),

A - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině výšky píku (mm).

Rozlišení (R_s) se vypočte ze vzorce:

$$R_s = \frac{1{,}18(t_{Rb} - t_{Ra})}{b_{0,5a} + b_{0,5b}},$$

$$t_{Rb} > t_{Ra}$$

v němž značí:

t_{Rb} a t_{Ra} - vzdálenosti podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků (mm),

$b_{0,5a}$ a $b_{0,5b}$ - šířky píků v polovině jejich výšky (mm).

Výsledky stanovení lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi měřenými píky v chromatogramu je větší než 1,0, pokud není předepsáno jinak.

Počet teoretických pater (n) se vypočte z údajů, získaných za izotermických podmínek ze vzorce:

$$n = 5{,}54\left(\frac{t_R}{b_{0,5}}\right)^2 ,$$

v němž značí:

t_R - vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu sledovaného píku (mm),

$b_{0,5}$ - šířku píku v polovině jeho výšky (mm).

Kapacitní poměr (D_m) (známý též jako kapacitní faktor) je definován jako:

$$D_m = \frac{\text{množství rozpuštěných látek ve stacionární fázi}}{\text{množství rozpuštěných látek v mobilní fázi}} = K\,\frac{V_s}{V_m} ,$$

v němž značí:

K - rovnovážný rozdělovací koeficient,

V_s - objem stacionární fáze,

V_m - objem mobilní fáze.

Kapacitní poměr složky může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = \frac{t_R - t_{R'}}{t_{R'}} ,$$

v němž značí:

t_R - vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku odpovídajícího složce (mm),

$t_{R'}$ - vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce (mm).

Poměr signálu k šumu (S/N) je počítán ze vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h_n},$$

v němž značí:

H - výšku píku odpovídajícího dané složce na chromatogramu získaném s předepsaným porovnávacím roztokem,

h_n - absolutní hodnotu největší výchylky signálu šumu od základní linie na chromatogramu kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce a sledovaného v rozsahu úměrném 20násobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku a pozorovaného v místě rovnoměrně situovaném okolo místa, kde by se tento pík nacházel.

2.2.30 Vylučovací chromatografie

Vylučovací chromatografie (s organickou mobilní fází je známá jako gelová chromatografie a s vodnou mobilní fází se používá název gelová filtrace) je chromatografická technika, která rozděluje molekuly v roztoku podle jejich velikosti. Vzorek je vnesen na kolonu naplněnou gelem nebo náplní s porézními částicemi a je nesen mobilní fází kolonou. K separaci podle velikosti dochází opakovanou výměnou rozpuštěných molekul (rozpuštěné látky) mezi rozpouštědlem v mobilní fázi a týmž rozpouštědlem v nepohyblivé kapalné fázi (stacionární fázi), která je v pórech náplně. Rozmezí velikosti pórů náplně určuje rozmezí velikosti molekul, ve kterém může dojít k separaci.

Molekuly, které jsou tak malé, že mohou pronikat do všech pórů, jsou eluovány s celkovým permeačním objemem (V_t). Molekuly výrazně větší než maximální velikost pórů náplně se pohybují v koloně jen prostory mezi částicemi náplně bez zadržování a jsou eluovány s vylučovacím objemem (V_0). K separaci podle velikosti molekul dochází mezi vylučovacím a celkovým permeačním objemem, přičemž použitelná je obvykle separace v prvních dvou třetinách tohoto rozmezí.

Zařízení. Základem zařízení je chromatografická kolona vhodných rozměrů, v případě potřeby termostatovaná, naplněná separačním materiálem schopným dělení ve vhodném rozsahu velikosti molekul, kterou protéká konstantní rychlostí eluent. Jeden konec kolony je obvykle připojen ke vhodnému zařízení pro nástřik vzorku, jako je adaptér průtoku, septový dávkovač nebo nastřikovací ventil, a může být také připojen ke vhodnému čerpadlu pro kontrolu průtoku eluentu. Případně může být vzorek nastřikován přímo na vstup kolony (povrch náplně kolony zbavený kapaliny), nebo je-li vzorek hustší než eluent, může být převrstven eluentem. Výstup z kolony je obvykle připojen k vhodnému detektoru spojenému s automatickým zapisovačem, který umožňuje záznam relativních koncentrací separovaných složek vzorku. Detektory jsou většinou založeny na fotometrických, refraktometrických nebo luminiscenčních vlastnostech. V případě potřeby může být připojen automatický sběrač frakcí.

Náplní může být měkký nosič, jako je nabobtnalý gel, nebo tuhý nosič tvořený sklem, silikagelem nebo zesíťovaným organickým polymerem kompatibilním s rozpouštědlem. Tuhé nosiče obvykle vyžadují tlakovaný systém umožňující rychlejší separace. Mobilní fáze je volena podle typu vzorku, separačního prostředí a způsobu detekce.

Před provedením separace by měla být náplň upravena a naplněna do kolony tak, jak je popsáno v článku nebo podle návodu výrobce.

V případě potřeby jsou v článcích uvedeny postupy pro ověření způsobilosti systému. Účinnost kolony může být vyhodnocena z počtu teoretických pater (n), vypočteného ze vzorce:

$$5{,}54\left(\frac{V_r}{b_{0,5}}\right)^2 ,$$

v němž značí:

V_r - retenční objem v maximu píku,

$b_{0,5}$ - šířku píku v polovině jeho výšky vyjádřenou ve stejných jednotkách jako retenční objem.

Stanovení distribučního koeficientu K_D

Eluční charakteristika látky na určité koloně může být dána distribučním koeficientem, K_D, který se vypočte ze vzorce:

$$\frac{V_r - V_0}{V_t - V_0} .$$

Stanovení se provede měřením retenčních objemů nezadržované složky (V_0), jiné složky, která může pronikat do všech pórů nosiče, (V_i), a látky, jejíž rozdělovací koeficient je stanovován, (V_r). Retenční objem se měří od nástřiku do maxima píku.

Stanovení poměrného složení směsi

Provede se separace podle článku. Je-li to možné, průběžně se zaznamenává eluce složek a měří se odpovídající plochy píků. Je-li zaznamenávána fyzikálně-chemická vlastnost a mají-li všechny stanovované složky vzorku stejnou odezvu (např. mají-li stejnou specifickou absorbanci), spočítá se relativní množství každé složky jako podíl příslušné plochy píku a součtu ploch píků všech stanovovaných složek. Nejsou-li detekční odezvy stanovovaných složek stejné, spočítá se obsah pomocí kalibračních křivek získaných s použitím kalibračních referenčních látek předepsaných v článku.

Stanovení molekulových hmotností

Vylučovací chromatografii lze použít pro stanovení molekulových hmotností po srovnání s vhodnými kalibračními referenčními látkami, specifikovanými v článku.

Do grafu se vynese závislost retenčních objemů kalibračních referenčních látek na logaritmu jejich molekulových hmotností. Křivka se obvykle blíží přímce mezi vylučovací mezí a mezí úplné permeace pro použité separační prostředí. Z kalibrační křivky se stanoví molekulové hmotnosti. Kalibrace pro molekulové hmotnosti je platná jen pro určitý makromolekulární systém látka/rozpou- štědlo za daných experimentálních podmínek.

Stanovení distribuce velikosti molekul polymerů

Vylučovací chromatografii lze použít pro stanovení distribuce velikosti molekul polymerů. Avšak porovnání vzorků je možné jen s výsledky získanými za stejných experimentálních podmínek. Látky použité pro kalibraci a metody stanovení distribuce velikosti molekul polymerů jsou uvedeny v článku.

2.2.31 Elektroforéza

Elektroforéza je fyzikálně-analytická metoda založená na pohybu elektricky nabitých částic rozpuštěných nebo dispergovaných v roztoku elektrolytu v elektrickém poli.

Elektroforetická pohyblivost je rychlost pohybu nabitých částic v m/s v elektrostatickém poli o intenzitě 1 V/m. Vyjadřuje se v $m^2.V^{-1}.s^{-1}$. Z praktických důvodů se používá $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$. Pohyblivost může být definována pouze pro daný elektrolyt za určitých experimentálních podmínek. Je ovlivněna mnoha faktory, např.:

- charakteristikou nabitých částic: druhem, velikostí, tvarem, elektrickým nábojem, koeficientem tření;
- charakteristikou kapaliny, ve které se nabité částice pohybují: rozpouštědlem, druhem a koncentrací elektrolytu, iontovou silou, pH, viskozitou roztoku.

Směr pohybu závisí na druhu elektrického náboje; nabité částice se pohybují k elektrodě s opačným nábojem.

Volná elektroforéza neboli elektroforéza s pohyblivým rozhraním

Tato metoda se hlavně užívá ke stanovení elektroforetické pohyblivosti, přičemž experimentální charakteristiky jsou přímo měřitelné a reprodukovatelné. Hlavně se používá u látek o vysoké relativní molekulové hmotnosti s nízkými difuzními koeficienty. Poloha rozhraní se na počátku

stanoví fyzikálními metodami, jako jsou refraktometrie nebo konduktometrie. Po aplikaci daného elektrického pole se po přesně změřeném čase pozorují nová rozhraní a jejich vzájemná poloha. Je nutno volit takové pracovní podmínky, které zajistí vznik a určení tolika rozhraní, kolik je složek.

Zónová elektroforéza v nosiči

Tato metoda vyžaduje pouze malé množství vzorku.

Druh nosiče, jako je papír, agarový gel, acetat celulosy, škrob, agarosa, methakrylamid, směsný gel, zavádí množství dalších faktorů ovlivňujících elektroforetickou pohyblivost:

a) následkem porozity nosiče je naměřená migrační vzdálenost menší než skutečná dráha iontu,
b) některé nosiče nejsou elektroneutrální, a mohou tedy vyvolat významný elektroosmotický tok,
c) jakékoliv zahřívání může vlivem Jouleova efektu způsobit odpařování kapaliny z nosiče, což v důsledku kapilarity způsobí pohyb roztoku od krajů do středu. Iontová síla z tohoto důvodu má tendenci postupně vzrůstat.

Rychlost pohybu potom závisí na čtyřech hlavních faktorech, zejména na pohyblivosti nabité částice, elektroendosmotickém proudění, na odpařování a intenzitě elektrického pole. Proto je nezbytné pracovat za zcela přesně definovaných experimentálních podmínek a používat, kdekoliv je to možné, referenčních látek.

Zařízení pro elektroforézu se skládá ze:

- *zdroje stejnosměrné elektrické energie*, jehož napětí může být regulováno a stabilizováno;
- *elektroforetické komory*; je obvykle pravoúhlá, vyrobená ze skla nebo pevného plastu se dvěma oddělenými prostory - anodickým a katodickým - obsahujícími roztok elektrolytu. V každém prostoru je ponořena elektroda, např. platinová nebo grafitová. Elektrody jsou propojeny vhodně izolovaným obvodem se zdrojem stejnosměrného proudu, čímž se vytvoří anoda a katoda. Hladina kapaliny v obou prostorech se udržuje na stejné úrovni, aby se předešlo vzájemnému přelévání.

  Elektroforetická komora je uzavřena vzduchotěsným víkem, které udržuje vlhkostí nasycenou atmosféru během operace a tím snižuje odpařování rozpouštědla. Víko může být opatřeno bezpečnostním zařízením, které po jeho sejmutí vypne elektrický proud. Jestliže elektrický výkon překročí 10 W, doporučuje se chlazení nosiče;
- *zařízení na upevnění nosiče*:

  Proužková elektroforéza. Proužek nosiče, předem navlhčený v používaném roztoku elektrolytu a ponořený na obou koncích do elektrodových prostorů, je vhodně napnutý a upevněný k vhodnému držáku nosiče, který zabrání difuzi elektrolytu. Držák může být vodorovný rámeček, podstavec ve tvaru obráceného V nebo podložka s vertikálně vyčnívajícími hroty umístěnými ve vhodných vzdálenostech;

  Gelová elektroforéza. Zařízení se skládá ze skleněné desky (např. mikroskopické sklíčko), na jejíž celou plochu je nanesena pevně přilnavá vrstva gelu stejné tloušťky. Elektrické spojení mezi gelem a vodivým roztokem je zajištěno různými způsoby podle druhu použitého zařízení. Je třeba učinit preventivní opatření, aby bylo zabráněno kondenzaci vlhkosti nebo vysychání pevné vrstvy;
- *měřicího nebo detekčního zařízení*.

Pracovní postup. Roztok nosného elektrolytu se nalije do elektrodových prostorů. Nosič nasycený elektrolytem se umístí do komory způsobem vhodným pro dané zařízení. Vyznačí se místo startu a nanese se vzorek. Na předepsanou dobu se zapojí energetický zdroj. Po vypnutí zdroje se nosič vyjme z komory, vysuší se a vizuálně posoudí.

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Při tomto typu elektroforézy je stacionární fází (nosičem) gel připravený ze směsi akrylamidu a N,N´-methylenbisakrylamidu. Gely se mohou připravit do trubiček 7,5 cm dlouhých a o vnitřním průměru 0,5 cm (trubičkové gely). V tomto případě se na jednu trubičku nanáší jeden roztok. Gely mohou být také připraveny mezi skleněnými deskami (deskový gel). Na takto připravený gel je možno nanášet více roztoků.

Zařízení. Skládá se ze dvou nad sebou umístěných nádobek na tlumivý roztok vyrobených z vhodného materiálu, jako je polymethylmethakrylát. Každá nádobka je vybavena platinovou elektrodou. Elektrody jsou připojeny ke zdroji umožňujícímu práci buď při konstantním proudu, nebo při konstantním napětí. Pro trubičkové gely je na dně horní nádobky několik držáků stejně vzdálených od elektrody. Pro deskové gely jsou k dispozici vyvíjecí komory umožňující dělení ve vertikální nebo horizontální poloze.

Postup stanovení. Před polymerací gelu by měly být roztoky odplyněny a gely používány okamžitě po přípravě.

a) Trubičkové gely

Připraví se směs gelu podle předpisu a nalije se do skleněných trubiček s uzavřeným dnem do stejné výšky asi 1 cm od horního okraje. Je nutno zajistit, aby v trubičce nezůstaly bublinky vzduchu. Směs gelu se převrství *vodou R*, aby se zamezilo přístupu vzduchu, a gel se nechá zpolymerovat. Tvorba gelu trvá asi 30 min a je ukončena, když se objeví ostré rozhraní mezi gelem a vrstvou vody. Vrstva vody se odstraní. Spodní nádobka se naplní předepsaným tlumivým roztokem a odstraní se uzávěry trubiček. Trubičky se upevní do držáků v horní nádobce tak, aby spodní část trubiček byla ponořena v tlumivém roztoku spodní nádobky. Trubičky se opatrně naplní předepsaným tlumivým roztokem. Připraví se zkoušený roztok a porovnávací roztok, které obsahují vhodné značkovací barvivo, a zahustí se např. *sacharosou R*. Tyto roztoky se nanášejí na povrch gelu jednotlivých trubiček, přičemž pro každý roztok se použije jiná trubička. Do horní nádobky se nalije stejný tlumivý roztok. Elektrody se připojí ke zdroji elektrické energie a elektroforéza se nechá probíhat za předepsané teploty a při předepsaném konstantním napětí nebo předepsané intenzitě proudu. Zdroj energie se vypne v okamžiku, kdy značkovací barvivo doputuje téměř ke spodní nádobce. Trubičky se okamžitě vyjmou ze zařízení a gel se z nich uvolní. Poloha jednotlivých zón se v elektroforeogramu deteguje předepsaným způsobem.

b) Deskové gely

Gelová směs se připraví předepsaným způsobem a vpraví se do vhodné formy buď pomocí pumpy, nebo nalitím. Je nutno zajistit, aby v gelu nezůstaly bublinky vzduchu. Otvory pro vzorky se mohou v gelu vytvořit přímo pomocí vhodného plastikového hřebene. Po zpolymerování gelu se uvolní dolní okraj desky, odřízne se nadbytečný polyakrylamid a odstraní se hřeben. Desky se upevní do komory a spodní nádobka se naplní předepsaným tlumivým roztokem. Otvory pro vzorky se opatrně naplní předepsaným tlumivým roztokem. Připraví se zkoušený roztok a porovnávací roztok, které obsahují vhodné značkovací barvivo, a zahustí se např. *sacharosou R*. Roztoky se odděleně nanesou do otvorů v horním okraji gelu. Horní nádobka se naplní předepsaným tlumivým roztokem. Elektrody se připojí ke zdroji elektrické energie a elektroforéza se nechá probíhat za předepsané teploty při předepsaném konstantním napětí nebo proudu. Zdroj energie se vypne v okamžiku, kdy značkovací barvivo doputuje k spodnímu okraji gelu. Desky se okamžitě vyjmou z aparatury a gel se uvolní. Poloha jednotlivých zón se deteguje v elektroforeogramu předepsaným způsobem.

Zaostřovací gel. Jestliže je v článku předepsáno použití zaostřovacího gelu, postupuje se, jak je uvedeno výše s následující modifikací. Směsí separačního gelu se naplní přibližně tři čtvrtiny celkové délky desky a nechá se zpolymerovat. Odstraní se vrstva vody a deska se doplní druhou

vrstvou zaostřovacího gelu připravenou způsobem předepsaným v článku. Jestliže je to potřebné, použije se plastikový hřeben k vytvoření otvorů pro nanesení vzorků a gel se nechá zpolymerovat. Na takto připraveném gelu by měla být vzdálenost mezi otvory pro vzorky a povrchem separačního gelu minimálně 1 cm až 2 cm.

V poslední době se používají stále více komerčně připravené polyakrylamidové gely, které zaručují lepší reprodukovatelnost výsledků.

2.2.32 Ztráta sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená ve hmotnostních procentech (*m/m*).

Postup zkoušky. Naváží se předepsané množství zkoušené látky do váženky předem vysušené za podmínek, předepsaných pro zkoušenou látku. Látka se vysuší do konstantní hmotnosti nebo se suší předepsanou dobu jedním z následujících postupů:

a) "v exsikátoru". Sušení se provádí nad *oxidem fosforečným R* při atmosférickém tlaku vzduchu a při pokojové teplotě;
b) "ve vakuu". Sušení se provádí nad *oxidem fosforečným R* při tlaku 1,5 kPa až 2,5 kPa a při pokojové teplotě;
c) "ve vakuu při stanoveném teplotním rozmezí". Sušení se provádí nad *oxidem fosforečným R* při tlaku 1,5 kPa až 2,5 kPa a teplotním rozmezí předepsaném v článku;
d) "v sušárně" při stanoveném teplotním rozmezí. Sušení se provádí v sušárně při teplotním rozmezí předepsaném v článku;
e) "pod vysokým vakuem". Sušení se provádí nad *oxidem fosforečným R* při tlaku, který nepřekročí 0,1 kPa a teplotě předepsané v článku.

Pokud jsou předepsány jiné podmínky, postupuje se přesně tak, jak je předepsáno v jednotlivém článku.

2.2.33 Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie

Nukleární magnetická rezonanční (NMR) spektrometrie je založena na skutečnosti, že atomová jádra jako ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P mají permanentní nukleární magnetický moment. Při vložení do vnějšího magnetického pole (hlavní pole) nabývají určitých, přesně definovaných orientací vzhledem ke směru tohoto pole, což odpovídá jednotlivým energetickým hladinám. Při dané intenzitě magnetické indukce dochází k přechodům mezi sousedními energetickými hladinami vlivem absorpce elektromagnetického záření charakteristických vlnových délek odpovídajících radiovým kmitočtům.

Tyto kmitočty lze určit buď postupným hledáním rezonančních podmínek (CW [continuous-wave] spektrometrie), nebo současnou excitací všech přechodů multifrekvenčním impulzem a následnou počítačovou analýzou vyhasínání volné indukce, při kterém se excitovaný systém vrací do základního stavu (pulzní spektrometrie).

Spektrum *protonové* magnetické rezonance se jeví jako soubor signálů, které odpovídají protonům a jsou charakteristické pro jejich nukleární a elektronové okolí v molekule. Rozdíl mezi daným signálem a signálem referenční látky se nazývá **chemický posun (δ)** a vyjadřuje se v ppm (parts per million). Charakterizuje druh protonu v závislosti na elektronovém okolí. Signály jsou často rozštěpeny do skupin vzájemně souvisejících píků nazývaných dublety, triplety, ... multiplety. Toto štěpení je způsobeno přítomností permanentních magnetických polí vytvářených sousedními jádry, zvláště protonů oddělených dvěma až pěti chemickými vazbami. Intenzita každého signálu se určí z plochy pod příslušným signálem a je úměrná počtu ekvivalentních protonů.

Přístroj. NMR-spektrometr pro CW-spektrometrii se skládá z magnetu, nízkofrekvenčního generátoru pro posun pole, držáku vzorku, radiofrekvenčního vysílače a přijímače, zapisovače a elektronického integrátoru. Pulzní spektrometr je dále vybaven pulzním vysílačem a počítačem pro sběr, uložení a matematickou transformaci dat na běžné spektrum.

Používá se NMR-spektrometr s kmitočtem minimálně 60 MHz pro ^{1}H. Pokud není předepsáno jinak, je třeba dodržovat instrukce výrobce přístroje. Před záznamem spektra je třeba ověřit, že:

1. Rozlišení je 0,5 Hz nebo méně při měření šířky píku v polovině výšky při použití přiměřeného rozsahu stupnice pro tyto píky:
   - buď pík při δ 7,33 ppm nebo při δ 7,51 ppm symetrického multipletu u 20% roztoku (*V/V*) *dichlorbenzenu R* v *deuterovaném acetonu R*,
   - nebo pík při δ 0,00 ppm pro 5% roztok (*V/V*) *tetramethylsilanu R* v *deuterovaném chloroformu R*,
2. Poměr signálu k šumu (*S/N*) měřený v rozmezí od δ 2 ppm do δ 5 ppm ve spektru 1% roztoku *ethylbenzenu R* v *tetrachlormethanu R* (*V/V*) je minimálně 25 : 1. Tento poměr se vypočte jako průměr z pěti stanovení podle vztahu:

$$S/N = 2{,}5\frac{A}{H},$$

   v němž značí:
   A - amplitudu v mm největšího píku methylenového kvartetu ethylbenzenu při δ 2,65 ppm, amplituda se měří od základní čáry procházející středem šumu na každé straně tohoto kvartetu a ve vzdálenosti minimálně 1 ppm od jeho středu,
   H - mezivrcholovou amplitudu šumu základní čáry změřenou v mm mezi δ 4 ppm a δ 5 ppm;
3. Amplituda postranních rotačních pásů není větší než 2 % amplitudy píku vzorku v kyvetě rotující rychlostí běžnou pro daný spektrometr;
4. Pro kvantitativní měření se ověří reprodukovatelnost integrátoru za použití 5% roztoku *ethylbenzenu R* v *tetrachlormethanu R* (*V/V*). Provede se pět po sobě jdoucích stanovení protonů fenylových a ethylových skupin a vypočtou se průměrné hodnoty, žádná z jednotlivých hodnot se nemá lišit od průměru o více než 2,5 %.

Postup měření. Zkoumaná látka se rozpustí podle předpisu a roztok se zfiltruje. Roztok musí být čirý. Použije se vnitřní standard, kterým je obvykle roztok obsahující 0,5 % až 1 % *tetramethylsilanu R* (TMS) v deuterovaném organickém rozpouštědle (*V/V*) nebo roztok *tetradeuteriotrimethylsilylpropionanu sodného R* 5 g/l až 10 g/l v *oxidu deuteria R*. Vezme se potřebné množství a zaznamená se spektrum.

CW-spektrometrie

Spektrometr se seřídí tak, aby pracoval pokud možno v čistě absorpčním modu a přitom nedošlo k saturaci signálů. Dále se nastaví tak, aby nejintenzivnější pík ve spektru zkoušené látky obsáhl téměř celý rozsah stupnice zapisovače a aby signál vnitřního standardu odpovídal chemickému posunu δ 0,00 ppm. Zaznamená se spektrum v požadovaném rozsahu, není-li uvedeno jinak, při rychlosti záznamu, která by neměla přesáhnout 2 Hz/s. Zaznamená se integrované spektrum ve stejném rozsahu a při vhodné rychlosti záznamu podle použitého přístroje. Kvantitativní měření se provede podle příslušného předpisu.

Pulzní spektrometrie

Akviziční parametry spektrometru (pulzní sklápěcí úhel, amplituda a délka pulzu, interval mezi pulzy, spektrální šířka, rozlišení a rychlost snímání) se nastaví podle instrukcí výrobce a shromáždí se nezbytný počet signálů vyhasínání volné indukce. Po matematické transformaci dat počítačem se nastaví fáze tak, aby se získalo pokud možno čisté absorpční spektrum, a provede se kalibrace

spektra vzhledem k rezonanční frekvenci odpovídající chemickému posunu vnitřního standardu. Spektrum uložené v počítači se zaznamená na vhodném výstupním zařízení a pro kvantitativní měření se provede integrace podle vybavení přístroje.

2.2.34 Termogravimetrie

Termická analýza je skupina technik, při kterých je měřena změna fyzikální vlastnosti látky v závislosti na teplotě. Nejběžněji užívanými jsou techniky, při nichž se měří změny energie nebo hmotnosti látky.

Termogravimetrie je technika, při které je zaznamenávána hmotnost vzorku látky jako funkce programovaně se měnící teploty.

Přístroj. Základními složkami termovah jsou zařízení pro ohřev a chlazení látky podle zadaného teplotního programu, nosič vzorku v kontrolované atmosféře, elektrováha a zapisovač. Přístroj může být spojen se zařízením umožňujícím analýzu těkavých produktů.

Ověření teploty. Kontrola teplotní stupnice se provádí pomocí niklu nebo jiného vhodného materiálu dle pokynů výrobce.

Kalibrace elektrováhy. Vhodné množství *šťavelanu vápenatého monohydrátu CRL* se vloží do nosiče vzorku a zaznamená se jeho hmotnost. Nastaví se rychlost ohřevu podle pokynů výrobce a spustí se teplotní program. Zaznamenává se termogravimetrická křivka jako graf s teplotou na ose úseček stoupající zleva doprava a hmotností na ose pořadnic stoupající zdola nahoru. Ohřev se přeruší asi při 230 °C. Na grafu se změří vzdálenost mezi počáteční a konečnou hmotnostně teplotní prodlevou, která odpovídá úbytku hmotnosti. Deklarovaný úbytek hmotnosti pro *šťavelan vápenatý monohydrát CRL* je udán v označení na obalu.

Postup zkoušky. Stejně se postupuje v případě stanovení zkoumané látky, přičemž se respektují podmínky předepsané v článku. Úbytek hmotnosti stanovované látky se vypočte ze vzdálenosti změřené v získaném grafu. Úbytek hmotnosti se vyjádří v hmotnostních procentech.

Používá-li se zařízení častěji, provádí se kontrola teploty a kalibrace pravidelně. Jinak se tyto kontroly provádějí před každým měřením.

2.2.35 Osmolalita

Osmolalitou se stanovují prakticky všechny rozpuštěné látky, které se podílejí na osmotickém tlaku roztoku.

Přijatelná aproximace pro osmolalitu ξ_m určitého vodného roztoku je dána vztahem:

$$\xi_m = \upsilon m \phi \ .$$

Není-li roztok ionizován, $\upsilon = 1$. Jestliže roztok je ionizován, υ je celkový počet iontů přítomných v roztoku nebo vytvořených solvolýzou z jedné molekuly rozpuštěné látky.

m - molalita roztoku, což je počet molů rozpuštěné látky na kilogram rozpouštědla,

Φ - molální osmotický koeficient, který udává počet interakcí mezi ionty opačného náboje v roztoku. Je závislý na hodnotě m. Zvyšuje-li se složitost roztoku, hodnotu Φ je obtížné měřit.

Jednotkou osmolality je osmol na kilogram (osmol/kg), ale obyčejně se používá odvozená jednotka miliosmol na kilogram (mosmol/kg).

Není-li uvedeno jinak, stanovuje se osmolalita měřením snížení teploty tuhnutí. Mezi osmolalitou a snížením teploty tuhnutí ΔT platí následující vztah:

$$\xi_m = \frac{\Delta T}{1{,}86} \ . \ 1000 \ \text{(mosmol/kg)}.$$

Přístroj. Přístroj (osmometr) se skládá ze:
- zařízení pro chlazení nádoby pro měření,
- systému pro měření teploty, obsahujícího elektrický odpor, citlivý na teplotu (termistor) a přístroje pro běžné měření proudu nebo měření rozdílu potenciálů, který má stupnici pro snížení teploty nebo přímo pro osmolalitu,
- zařízení pro míchání vzorku (obvykle součást přístroje).

Tab. 2.2.35-1 Porovnávací roztoky pro kalibraci osmometru

Obsah *chloridu sodného R* v g/kg *vody R*	Skutečná osmolalita (mosmol/kg)	Ideální osmolalita (mosmol/kg)	Molální osmotický koeficient	Kryoskopické snížení (° C)
3,087	100	105,67	0,9463	0,186
6,260	200	214,20	0,9337	0,372
9,463	300	323,83	0,9264	0,558
12,684	400	434,07	0,9215	0,744
15,916	500	544,66	0,9180	0,930
19,147	600	655,24	0,9157	1,116
22,380	700	765,86	0,9140	1,302

Pracovní postup. Připraví se požadované porovnávací roztoky, jak je uvedeno v tab. 2.2.35-1. Nastaví se nulová hodnota přístroje na *vodu R*. Pak se provede kalibrace přístroje pomocí porovnávacích roztoků. Do měřicí kyvety se dá 50 μl až 250 μl vzorku a zapne se chladicí systém. Přístroj má obvykle míchací systém naprogramovaný tak, aby pracoval při nižší teplotě, než je teplota očekávaná v průběhu kryoskopického snížení, aby nenastalo přechlazení. Vhodným zařízením se indikuje dosažení rovnováhy. Před každým měřením se nádobka vypláchne roztokem, který se pak měří.

Stejným způsobem se postupuje se zkoušenými vzorky. Osmolalita se odečte přímo na přístroji nebo se vypočítá ze snížení teploty tuhnutí. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že nalezená hodnota leží v intervalu daném kalibrační křivkou.

2.2.36 Potenciometrické stanovení koncentrace iontů pomocí iontově selektivních elektrod

Za ideálních podmínek závisí potenciál E iontové selektivní elektrody lineárně na logaritmu aktivity a_i příslušného iontu, což vyjadřuje Nernstova rovnice:

$$E = E_0 + 2{,}303 \frac{RT}{z_i F} \log a_i,$$

v níž značí:
E_0 - standardní elektrodový potenciál,
R - univerzální plynovou konstantu,
T - absolutní teplotu,
F - Faradayovu konstantu,
z_1 - náboj příslušného iontu včetně znaménka.

Při konstantní iontové síle platí vztah:

$$E = E_0 + \frac{k}{z_i} \log f\, C_i \ ,$$

v němž značí:
C_i - molární koncentraci příslušného iontu,
f - aktivitní koeficient ($a_i = f\, C_i$),

$$k = \frac{RT}{F}.$$

Tab. 2.2.36-1 Hodnoty *k* při různých teplotách

Teplota (°C)	*k*
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0602

Jestliže označíme $E_0 + \frac{k}{z_i} \log f = E_0^{/}$ a $S = \frac{k}{z_i}$,

kde *S* je směrnice lineární části kalibrační křivky této elektrody, pak platí následující rovnice:

$$E = E_0^{/} + S \log C_i \ .$$

Je-li $-\log C_i = pC_i$, pak lze psát: $E = E_o^{/} - SpC_i$.

Potenciometrické stanovení koncentrace příslušného iontu se provádí měřením potenciálního rozdílu mezi dvěma vhodnými elektrodami ponořenými do zkoušeného roztoku. Indikační elektroda je selektivní pro iont, který má být stanoven, druhá elektroda je referenční.

Zařízení. Použije se voltmetr umožňující měření s přesností na 0,1 milivoltů (mV), jehož vstupní impedance je alespoň stokrát větší než impedance použitých elektrod.

Iontově selektivní elektrody mohou být elektrody s krystalickou či nekrystalickou membránou nebo s vhodnou tuhou matricí (např. skleněné elektrody) nebo elektrody s nabitými (pozitivně či negativně) či nenabitými pohyblivými nosiči náboje či tzv. senzitivované elektrody (enzym-substrát elektrody, plynové indikační elektrody). Srovnávací elektrodou je zpravidla argentchloridová nebo kalomelová elektroda, případně se solným můstkem naplněným vhodným neinterferujícím roztokem.

Postup měření. Měření se provádí při konstantní teplotě ±0,5 °C, přičemž se bere v úvahu změna směrnice části kalibrační křivky elektrody s teplotou (viz tab. 2.2.36-1). Upraví se iontová síla a případně i pH roztoku, který má být analyzován použitím tlumivých roztoků popsaných v článku, a elektroda se uvede do rovnovážného stavu ponořením do analyzovaného roztoku za pomalého a rovnoměrného míchání, dokud se měřená hodnota neustálí.

Je-li elektrodový systém často používán, kontroluje se pravidelně opakovatelnost a stabilita odezvy a linearita kalibrační křivky či výpočtový algoritmus v koncentračním rozmezí zkoušeného roztoku. Není-li systém používán často, provede se tato zkouška před každou sérií měření. Odezva elektrody může být považována za lineární, pokud je směrnice *S* kalibrační křivky přibližně rovna k/z_i na jednotku pC_i.

Metoda I - Přímá kalibrace

Změří se alespoň třikrát za sebou potenciál nejméně tří porovnávacích roztoků pokrývajících očekávanou koncentraci ve zkoušeném roztoku. Vypočte se kalibrační křivka nebo se vynese do grafu střední hodnota získaného potenciálu E proti koncentraci stanovovaného iontu vyjádřené jako -log C_i nebo pC_i.

Připraví se zkoušený roztok, jak je předepsáno v článku. Změří se třikrát příslušný potenciál a z jeho průměrné hodnoty se určí pomocí kalibrační křivky koncentrace stanovovaného iontu.

Metoda II - Vícenásobný standardní přídavek

Připraví se zkoušený roztok, jak je předepsáno v článku. Změří se rovnovážný potenciál E_T tohoto roztoku o objemu V_T, který obsahuje neznámou koncentraci $_TC$ stanovovaného iontu. Provedou se alespoň tři následné přídavky porovnávacího roztoku o koncentraci C_s, která leží uvnitř lineární části kalibrační křivky, a o objemu V_s, který je zanedbatelný ve srovnání s V_T ($V_s \leq 0{,}01\ V_T$). Po každém přídavku se změří potenciál a vypočítá se potenciální rozdíl ΔE mezi tímto změřeným potenciálem a E_T.

Mezi ΔE a koncentrací stanovovaného iontu platí vztah:

$$\Delta E = S \log \left(1 + \frac{C_s V_s}{C_T V_T} \right)$$

nebo

$$10^{\frac{\Delta E}{S}} = 1 + \frac{C_s V_s}{C_T V_T} ,$$

v němž značí:

V_T - objem zkoušeného roztoku,
C_T - koncentraci stanovovaného iontu ve zkoušeném roztoku,
V_s - přidaný objem porovnávacího roztoku,
C_s - koncentraci stanovovaného iontu v porovnávacím roztoku,
S - směrnici kalibrační křivky elektrody. Směrnice se stanovuje experimentálně při konstantní teplotě měřením rozdílu mezi potenciály získanými pomocí dvou porovnávacích roztoků, jejichž koncentrace se liší desetkrát a leží v oblasti, kde je kalibrační křivka lineární.

Vynese se do grafu závislost $10^{\frac{\Delta E}{S}}$ (osa pořadnic - y) proti V_s(osa úseček - x) a extrapoluje se získaná závislost (přímka), aby protnula osu x. V tomto průsečíku je koncentrace C_T stanovovaného iontu ve zkoušeném roztoku dána rovnicí:

$$C_T = \frac{C_s V_s}{V_T} .$$

Metoda III - Jeden standardní přídavek

K objemu V_T zkoušeného roztoku připraveného tak, jak je předepsáno v článku, se přidá objem V_s porovnávacího roztoku obsahujícího takové množství stanovovaného iontu, o němž je známo, že poskytuje odezvu v lineární části kalibrační křivky. Za stejných podmínek se připraví slepá zkouška. Změří se alespoň třikrát potenciály zkoušeného roztoku a slepé zkoušky před a po přidání porovnávacího roztoku. Vypočte se koncentrace C_T stanovovaného iontu pomocí následující rovnice a provede se nezbytná korekce na slepou zkoušku:

$$C_T = \frac{C_s V_s}{10^{\frac{\Delta E}{S}} (V_T + V_s) - V_T} ,$$

v níž značí:
V_T - objem zkoušeného roztoku nebo slepé zkoušky,
C_T - koncentraci stanovovaného iontu ve zkoušeném roztoku,
V_s - přidaný objem porovnávacího roztoku,
C_s - koncentraci stanovovaného iontu v porovnávacím roztoku,
ΔE - rozdíl mezi průměrnými hodnotami potenciálů měřenými před a po přidání V_s,
S - směrnici kalibrační křivky elektrody stanovenou experimentálně při konstantní teplotě proměřením rozdílu mezi potenciály získanými pomocí dvou porovnávacích roztoků, jejichž koncentrace se liší desetkrát a které jsou v koncentračním rozmezí, v němž je kalibrační závislost lineární.

2.2.37 Rentgenová fluorescenční spektrometrie[3)]

Rentgenová (vlnově disperzní) fluorescenční spektrometrie je metoda, která používá měření intenzity fluorescenčního záření emitovaného prvky s atomovým číslem mezi 11 a 92 excitovanými primárním rentgenovým zářením. Intenzita fluorescence emitovaná daným prvkem závisí na koncentraci tohoto prvku ve vzorku a také na absorpci dopadajícího a fluorescenčního záření matricí vzorku. Při stopových koncentracích, kde je kalibrační křivka lineární, intenzita fluorescenčního záření emitovaného prvkem v dané matrici při dané vlnové délce je úměrná koncentraci tohoto prvku a nepřímo úměrná hmotnostnímu absorpčnímu koeficientu matrice při této vlnové délce.

Postup stanovení. Seřízení a použití přístroje se provádí podle pokynů uvedených výrobcem. Tekuté vzorky se umístí přímo do přístroje, pevné vzorky se nejprve slisují do tablet, někdy po smíchání s vhodným pojivem.

Ke stanovení koncentrace prvku ve vzorku je nezbytné změřit četnost impulzů (po odečtení pozadí), produkovaných jednou nebo několika standardními látkami obsahujícími známá množství tohoto prvku v dané matrici, a vypočítat nebo změřit hmotnostní absorpční koeficient matrice analyzovaného vzorku.

Kalibrace. Z kalibračního roztoku nebo řady naředěných roztoků analyzovaného prvku v různých matricích se stanoví směrnice kalibrační křivky b_0 z následujícího vztahu:

$$b_0 \frac{1}{\mu_M} = \frac{I_C^N}{C} ,$$

v němž značí:
μ_M - absorpční koeficient matrice M, vypočítaný nebo změřený,
I_C^N - četnost impulzů po odečtení pozadí (dále jen četnost impulzů),
C - koncentrace stanovovaného prvku ve standardní látce.

[3)] Andermann, G., Kemp, M. W.: Analytical Chemistry, 30, 1958, 1306.
Kalman, Z. H., Heller, L.: Analytical Chemistry, 34, 1962, 946.
Reynolds, R. C. Jr.: The American Mineralogist, 46, 1963, 1133.
Müller, R. O.: Spectrochimica Acta, 20, 1964, 143.
Müller, R. O.: Spectrochemische Analyse mit Röntgenfluoreszenz. München-Wien, R. Oldenburg 1967.

Hmotnostní absorpční koeficient matrice vzorku. Jestliže je empirický vzorec analyzovaného vzorku známý, vypočítá se jeho hmotnostní absorpční koeficient ze známého prvkového složení a tabelovaných hmotnostních absorpčních koeficientů prvků. Není-li prvkové složení známé, stanoví se hmotnostní absorpční koeficient matrice vzorku změřením intenzity rozptýleného rentgenového záření I_U (Comptonův rozptyl) z následujícího vztahu:

$$\frac{1}{\mu_{\mathrm{MP}}} = a + bI_U ,$$

v němž značí:
μ_{MP} - hmotnostní absorpční koeficient vzorku,
I_U - intenzitu rozptýleného rentgenového záření.

Stanovení četnosti impulzů stanovovaného prvku ve vzorku. Vypočítá se četnost impulzů I_{EP}^{N} stanovovaného prvku ze změřené intenzity fluorescenční linie a intenzity linie (linií) pozadí.

Výpočet stopového obsahu. Jestliže koncentrace prvku se nachází v lineární části kalibrační křivky, může být vypočítána s použitím následujícího vztahu:

$$C = \frac{I_{\mathrm{EP}}^{N}}{b_0 \dfrac{1}{\mu_{\mathrm{MP}}}} \cdot f ,$$

v němž značí:
f - faktor zředění.

2.2.38 Měrná elektrická vodivost

Měrná elektrická vodivost (konduktivita), dále jen měrná vodivost roztoku (κ), je definována jako převrácená hodnota měrného odporu (rezistivity) (ρ), který je definován jako podíl intenzity elektrického pole a proudové hustoty. Elektrický odpor (rezistance) R (Ω) vodiče o průřezu S (cm^2) a délce l (cm) je vyjádřen vztahem:

$$R = \rho\frac{l}{S} \text{ nebo } R = \frac{1}{\kappa} \cdot \frac{l}{S} , \text{ kde } \kappa = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{S} .$$

Mezinárodní jednotkou (SI) měrné vodivosti je siemens na metr ($\mathrm{S.m^{-1}}$); obvykle se měrná vodivost roztoku vyjadřuje v $\mathrm{S.cm^{-1}}$, $\mathrm{mS.cm^{-1}}$ nebo $\mu\mathrm{S.cm^{-1}}$. Jednotkou měrného odporu je Ω.m, obvykle se užívá Ω.cm. Pokud není uvedeno jinak, je referenční teplota pro měření měrné vodivosti a měrného odporu 20 °C.

Zařízení. Používaný přístroj (konduktometr nebo přístroj na měření odporu - ohmmetr) měří odpor kapaliny mezi elektrodami vodivostní sondy ponořené do měřené kapaliny. Přístroj je vybaven zařízením na kompenzaci teploty nebo přesným teploměrem. Aby nedocházelo k polarizaci elektrod vodivostní sondy, používá se při měření měrné vodivosti kapalin střídavý elektrický proud.

Vodivostní sonda je tvořena dvěma paralelními platinovými elektrodami vzdálenými od sebe l a pokrytými platinovou černí, z nichž každá má plochu povrchu S. Elektrody jsou chráněny skleněnou trubicí, která umožňuje dobrou výměnu mezi roztokem a elektrodami.

Konstanta vodivostní sondy (K) je dána v $\mathrm{cm^{-1}}$ podle následujícího vzorce:

$$K = \alpha\frac{l}{S} ,$$

v němž značí:
α - bezrozměrný číselný koeficient charakteristický pro konstrukci vodivostní sondy.

Zkoumadla. Připraví se tři standardní roztoky *chloridu draselného R* obsahující 0,7455 g, 0,0764 g a 0,0149 g *chloridu draselného R* na 1000 g roztoku s použitím *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R*, jejíž měrný odpor nepřesahuje 2 µS.cm^{-1}.

Měrný odpor a měrná vodivost těchto tří roztoků při 20 °C je uvedena v tabulce 2.2.38-1.

Tab. 2.2.38-1 Měrný odpor a měrná vodivost standardních roztoků chloridu draselného při 20 °C

Koncentrace v g/1000,0 g roztoku	Měrná vodivost µS.cm^{-1}	Měrný odpor Ω.cm
0,7455	1330	752
0,0746	133,0	7519
0,0149	26,6	37594

Pokud stanovení nemůže být provedeno při 20 °C, použije se ke korekci měrné elektrické vodivosti roztoků chloridu draselného uvedených v předcházející tabulce následující vzorec, který je platný pouze pro teploty v rozsahu (20 ± 5) °C:

$$\kappa_T = \kappa_{20}[1 + 0{,}021(T - 20)] ,$$

v němž značí:

T - teplotu měření předepsanou v článku,

κ_T - měrnou vodivost roztoku KCl při teplotě T,

κ_{20}- měrnou vodivost roztoku KCl při 20 °C.

Stanovení konstanty vodivostní sondy

Vybere se vodivostní sonda, která je vhodná pro měření měrné vodivosti zkoušeného roztoku. Čím je vyšší očekávaná hodnota měrné vodivosti, tím je třeba použít vodivostní sondy o vyšší konstantě (nízké ρ), aby změřená hodnota R byla co největší pro použitý přístroj. Běžně používané vodivostní sondy mají konstanty řádově 0,1 cm^{-1}, 1 cm^{-1} a 10 cm^{-1}. Použije se standardní roztok *chloridu draselného R*, který je vhodný pro měření. Sonda se opláchne několikrát *vodou prostou oxidu uhličitého R*, která byla připravena z *vody destilované R*, a nejméně dvakrát standardním roztokem chloridu draselného použitým ke stanovení konstanty vodivostní sondy. Změří se elektrická vodivost (konduktance) nebo elektrický odpor (rezistance) vodivostní sondy při (20 ± 0,1) °C nebo při teplotě předepsané v článku. Konstanta K (v cm^{-1}) je dána vztahem:

$$K = \frac{\kappa_{KCl}}{G_{KCl}} \quad \text{nebo} \quad K = R_{KCl} \cdot \kappa_{KCl} ,$$

v nichž značí:

κ_{KCl} - tabulkovou měrnou vodivost použitého standardního roztoku *chloridu draselného R* (µS.cm^{-1}),

G_{KCl} - elektrickou vodivost použitého standardního roztoku *chloridu draselného R* změřenou za stejných podmínek jako u zkoušeného vzorku (µS),

R_{KCl} - odpor standardního roztoku *chloridu draselného R* (MΩ).

Změřená konstanta K vodivostní sondy se může lišit o 5 % od dané hodnoty.

Poznámka: K některým konduktometrům je dodávána pouze jedna vodivostní sonda. Její konstanta (K) se stanoví za použití standardního roztoku *chloridu draselného R*, který je vhodný pro vlastní měření.

Stanovení měrné vodivosti vody nebo zkoušeného roztoku

Po kalibraci přístroje jedním ze standardních roztoků se opláchne vodivostní sonda několikrát *vodou prostou oxidu uhličitého R* připravenou z *vody destilované R* a nejméně dvakrát zkoušenou

vodou nebo zkoušeným roztokem při (20 ± 0,1) °C nebo při teplotě předepsané v článku. Provedou se postupná měření, jak je předepsáno v článku.

2.2.39 Stanovení distribuce molekulových hmotností v dextranu

Distribuce (zastoupení) jednotlivých molekulových hmotností v dextranu se stanoví metodou vylučovací chromatografie (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. 0,200 g zkoušené látky se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml.
Značkovací roztok. 5 mg *glukosy R* a 2 mg *dextranu V_o CRL* se rozpustí v 1 ml mobilní fáze.
Kalibrační roztoky. Odděleně se rozpustí vždy v 1 ml mobilní fáze 15 mg *kalibračního dextranu 4 CRL*, 15 mg *kalibračního dextranu 10 CRL*, 20 mg *kalibračního dextranu 40 CRL*, 20 mg *kalibračního dextranu 70 CRL* a 20 mg *kalibračního dextranu 250 CRL*.
Roztok pro test způsobilosti systému. Rozpustí se buď 20 mg *testovacího dextranu 40 CRL* (pro dextran 40), nebo 20 mg *testovacího dextranu 60/70 CRL* (pro dextran 60 a dextran 70) v 1 ml mobilní fáze.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,3 m a vnitřního průměru 10 mm, naplněné *agarosou síťovanou pro chromatografii R*, nebo do série spojených kolon délky 0,3 m a vnitřního průměru 10 mm naplněných gelem *hydroxylovaného polyetheru pro chromatografii R*,
- mobilní fáze připravené ze 7 g *síranu sodného bezvodého R* a 1 g *chlorbutanolu R* v 1 l *vody R* při průtokové rychlosti 0,5 ml/min až 1,0 ml/min udržované v konstantním rozmezí ±1 %/h,
- diferenčního refraktometru jako detektoru,
- dávkovacího zařízení se smyčkou 100 µl až 200 µl.

Teplota systému se udržuje konstantní (±0,1 °C).

Kalibrace chromatografického systému. Nastříkne se opakovaně zvolený objem značkovacího roztoku. Chromatogram ukáže dva píky, z nichž první odpovídá *dextranu V_0 CRL* a druhý *glukose R*. Z elučního objemu píku dextranu V_0 se počítá volný objem V_0 a z elučního objemu píku glukosy se spočítá celkový objem V_t.

Nastříkne se zvolený objem každého z kalibračních roztoků. Zakreslí se pečlivě základní linie všech chromatogramů. Každý chromatogram se rozdělí na *p* (nejméně šedesát) stejně velkých vertikálních úseků (odpovídajících stejným elučním objemům). V každém úseku *i* odpovídajícím elučnímu objemu V_i se změří výška linie chromatogramu *y* nad základní linií a vypočítá se distribuční koeficient K_i za použití výrazu:

$$\frac{(V_i - V_0)}{(V_t - V_0)}, \qquad (1)$$

v němž značí:
V_0 - volný objem kolony stanovený pomocí píku *dextranu V_0 CRL* na chromatogramu značkovacího roztoku,
V_t - celkový objem kolony stanovený pomocí píku *glukosy R* na chromatogramu značkovacího roztoku,
V_i - eluční objem úseku *i* na chromatogramu jednotlivých kalibračních roztoků.

Provede se kalibrace za použití některé z následujících metod.

Kalibrace grafická. S použitím výrazu (1) se vypočítá pro každý *kalibrační dextran CRL* distribuční koeficient K_{max} odpovídající maximální výšce linie chromatogramu. Hodnoty K_{max} se vynesou do grafu na semilogaritmický papír (na osu *x*) proti deklarované molekulové hmotnosti

odpovídající maximální výšce linie chromatogramu (M_{max}) každého z kalibračních dextranů a glukosy. Získanými body se proloží první kalibrační křivka, přičemž se extrapoluje z bodu K_{max} vypočítaného pro *kalibrační dextran 250 CRL* k nejnižší vypočítané hodnotě K získané pro tento CRL (viz obr. 2.2.39-1). S využitím této první kalibrační křivky se pro každý chromatogram transformují všechny hodnoty K_i na odpovídající molekulové hmotnosti M_i, čímž se získá distribuce molekulových hmotností. Pro každý kalibrační dextran se pomocí rovnice (3) uvedené níže vypočítá průměrná molekulová hmotnost M_w. Jestliže se vypočítané hodnoty M_w neliší o více než 5 % od hodnot deklarovaných pro každý kalibrační dextran a průměrný rozdíl je v rozmezí ±3 %, kalibrační křivka může být použita pro stanovení distribuce molekulových hmotností. V opačném případě se výše popsaný postup opakuje, až se vypočítané a deklarované hodnoty M_w neliší o více než 5 %.

Kalibrace výpočtem křivky. Z rovnic (2) a (3) uvedených níže se použitím vhodné metody[4)] vypočítají hodnoty pro b_1, b_2, b_3, b_4 a b_5 tak, aby se hodnoty M_w pro kalibrační dextrany lišily nejvýše o 5 % od hodnot deklarovaných a M_w glukosy činila 180 ± 2:

$$M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 K_i + b_2 K_i^2 + b_3 K_i^3)} \tag{2}$$

$$\bar{M}_W = \frac{\sum_{i=1}^{p} (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^{p} y_i}, \tag{3}$$

kde značí:

p - počet úseků dělících chromatogramy,

y_i - výšku chromatografické linie nad základní linií v úseku i,

M_i - molekulovou hmotnost v úseku i.

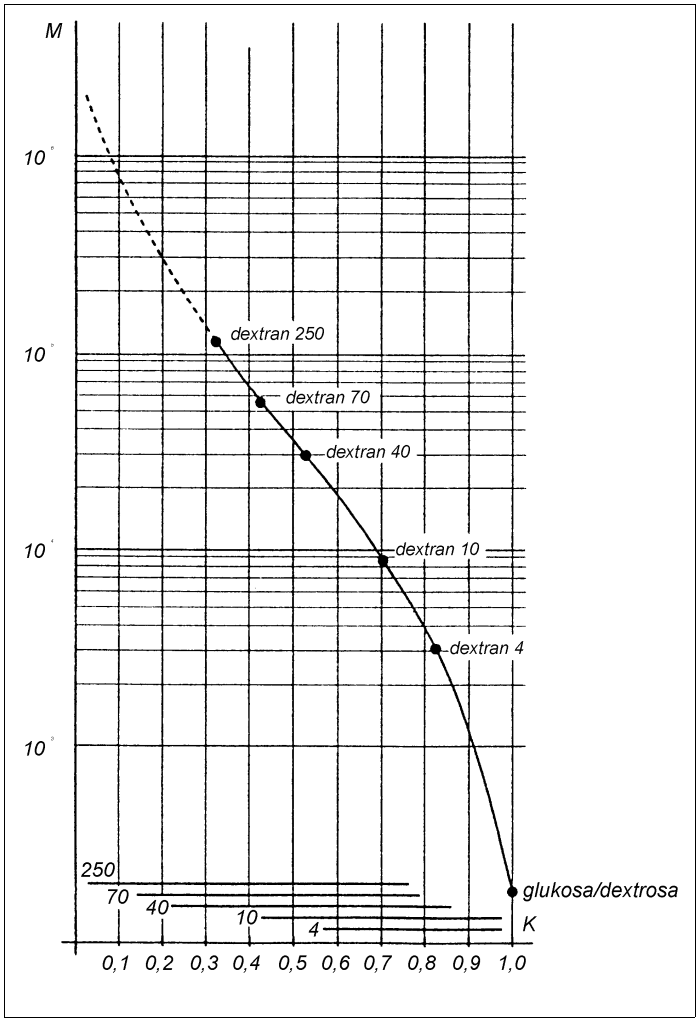
Zkouška způsobilosti systému. Nastříkne se zvolený objem roztoku pro zkoušku způsobilosti systému.

Průměrná molekulová hmotnost testovacího dextranu CRL. Vypočítá se průměrná molekulová hmotnost M_w způsobem popsaným v odstavci "Kalibrace chromatografického systému" za použití buď kalibrační křivky, nebo hodnot b_1, b_2, b_3, b_4 a b_5, získaných výše uvedeným způsobem. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že M_w je:

- 41 000 až 47 000 (*testovací dextran 40 CRL*),
- 67 000 až 75 000 (*testovací dextran 60/70 CRL*).

---

4) Je vhodná iterační metoda Gaussova-Newtonova modifikovaná Hartleyem (Hartley, O.: Tecnometrics, 3, 1961 a Nilsson, G., Nilsson, K.: J. Chromat., 101, 1974, 137 nejlépe ve spojení s programem pro nelineární regresi.



Obr. 2.2.39-1 Příklad kalibrační křivky

Tečkovaná čára odpovídá extrapolované části křivky. Vodorovné přímky ve spodní části obrázku znázorňují šířku a polohu chromatografické linie každého z kalibračních dextranů.

Průměrná molekulová hmotnost 10% vysoké frakce dextranu. Pro 10% vysokou frakci dextranu eluovanou v úseku chromatogramu n se vypočítá M_w podle vzorce:

$$\bar{M}_W = \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^{n} y_i} , \qquad (4)$$

kde n je dáno výrazy:

$$\sum_{i=1}^{n} y_i \leq 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \tag{5}$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i > 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) , \tag{6}$$

v nichž značí:
p - počet úseků dělících chromatogram,
y_i - výšku linie chromatogramu nad základní linií v úseku i,
M_i - molekulovou hmotnost v úseku i.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že M_w je:
- 110 000 až 130 000 (*testovací dextran 40 CRL*),
- 190 000 až 230 000 (*testovací dextran 60/70 CRL*).

Průměrná molekulová hmotnost 10% nízké frakce dextranu. Pro 10% nízkou frakci dextranu eluovanou v úseku m a před ním se vypočítá M_w podle vzorce:

$$M_W = \frac{\sum_{i=m}^{p} (y_i M_i)}{\sum_{i=m}^{p} y_i} , \tag{7}$$

kde m je dáno výrazy:

$$\sum_{i=m}^{p} y_i \leq 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \tag{8}$$

$$\sum_{i=m-1}^{p} y_i > 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) , \tag{9}$$

v nichž značí:
p - počet úseků dělících chromatogramy,
y_i - výšku linie chromatogramu nad základní linií v úseku i,
M_i - molekulovou hmotnost v úseku i.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že M_w 10% nízké frakce dextranu je:
- 6000 až 8500 (*testovací dextran 40 CRL*),
- 7000 až 11 000 (*testovací dextran 60/70 CRL*).

Distribuce molekulových hmotností zkoušeného dextranu. Nastříkne se zvolený objem zkoušeného roztoku a vypočítají se M_w pro celkovou distribuci molekulových hmotností, M_w pro 10% vysokou frakci dextranu a M_w pro 10% nízkou frakci dextranu způsobem popsaným v odstavci "Zkouška způsobilosti systému".

2.2.40 Spektrometrie v blízké infračervené oblasti

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti je metoda, která se uplatňuje zejména při identifikaci organických látek. Přestože jsou spektra omezena na pásy kombinačních vibrací a overtonů fundamentálních vibrací C-H, N-H, O-H a S-H, mají obvykle vysokou informační hodnotu. Spektra však jsou závislá na mnoha parametrech, jako jsou velikost částic, polymorfismus, zbytková rozpouštědla, vlhkost ap., které nemohou být vždy kontrolovány. Proto není obvykle možné přímo

porovnat spektrum zkoušené látky s referenčním spektrem a je nutno provést vhodné, validované matematické zpracování naměřených dat.

Přístroje. Spektrometry pro měření spekter v blízké infračervené oblasti mají tyto části:

- filtr, mřížku nebo interferometr vhodné pro měření v oblasti elektromagnetického záření přibližně 780 nm až 2500 nm (12821 cm^{-1} až 4000 cm^{-1}),
- zařízení na sběr a měření intenzity prošlého nebo odraženého záření (transmise nebo reflexe), jako jsou integrační koule, sonda s optickým vláknem ap., ve spojení s vhodným detektorem,
- prostředky pro matematické zpracování naměřených spektrálních dat.

Příprava vzorku

Pro transmisní měření. Tato metoda se používá převážně pro měření kapalin, zředěných nebo nezředěných, a pro roztoky pevných látek.

Vzorky se měří buď v kyvetě vhodné tloušťky (obvykle 0,5 mm až 4 mm) propustné v blízké infračervené oblasti, nebo po ponoření vhodné sondy s optickým vláknem, která umožňuje změření spektra v oblasti odpovídající specifikacím přístroje.

Při měření spekter kapalin v blízké infračervené oblasti je třeba brát v úvahu vliv teploty a ostatní možné fyzikální vlivy vyvolávající změny ve spektrech.

Ve všech případech je třeba provést kompenzaci rušivých vlivů pozadí způsobem, který odpovídá optickému uspořádání přístroje, např. se odečte referenční spektrum vzduchu (u kapalin) nebo rozpouštědla (u roztoků) od spektra zkoušené látky.

Pro měření difuzním odrazem. Tato metoda se používá převážně pro měření pevných látek.

Vzorky se měří ve vhodném zařízení. Při měřeních s optickou sondou je nutno zajistit konstantní polohu sondy během měření spekter a maximální možnou reprodukovatelnost podmínek měření pro jednotlivé vzorky.

Ve všech případech je třeba provést kompenzaci rušivých vlivů pozadí způsobem, který odpovídá optickému uspořádání přístroje, např. je třeba odečíst referenční spektrum vnitřního nebo vnějšího reflexního standardu od spektra zkoušené látky.

Rovněž je nutno věnovat pozornost vlivu velikosti částic, dále stavu hydratace nebo solvatace.

Pro měření transflektance. Používá se převážně pro měření kapalin, zředěných nebo nezředěných, a pro pevné látky v roztoku nebo v suspenzi.

Vzorek se měří v kyvetě, do které se ve vhodné koncentraci vpraví inertní látky neabsorbující v blízké infračervené oblasti (např. kovové částice nebo oxid titaničitý). Měření se provádí způsobem popsaným v odstavcích "Pro transmisní měření" a "Pro měření difuzním odrazem".

Kontrola správné funkce přístroje

Přístroj nutno používat podle pokynů výrobce a v pravidelných intervalech provádět předepsaná ověřování.

Ověření stupnice vlnových délek (neprovádí se u přístrojů s filtrem). Pro ověření použité stupnice vlnových délek (obvykle v rozsahu 780 nm až 2500 nm) se použije vhodný standard (nebo několik standardů), který má charakteristická maxima v oblasti vlnových délek, v níž se provádí měření, např. polystyren nebo oxidy vzácných zemin.

Ověření reprodukovatelnosti měření vlnových délek (neprovádí se u přístrojů s filtrem). Pro ověření reprodukovatelnosti vlnových délek se použije vhodný standard (nebo několik standardů), např. polystyren nebo oxidy vzácných zemin. Směrodatná odchylka vlnových délek odpovídá specifikaci přístroje.

Ověření opakovatelnosti odezvy detektoru. Pro ověření opakovatelnosti odezvy detektoru se použije vhodný standard (nebo několik standardů), např. reflexní termoplastické pryskyřice, k nimž byly přidány saze. Směrodatná odchylka maxima odezvy musí odpovídat specifikaci přístroje.

Ověření fotometrického šumu. Pro měření šumu se použije vhodný reflexní standard, např. bílá keramická destička nebo termoplastické pryskyřice. Změří se v rozsahu spektra 100% linie tohoto standardu dle návodu výrobce a vypočte se šum buď jako mezivrcholová hodnota signálu, nebo jako směrodatná odchylka odezev pro danou vlnovou délku. Hodnota šumu musí odpovídat specifikaci přístroje.

Vytvoření knihovny referenčních spektrálních dat

Zaznamenají se spektra vhodného počtu šarží substance ověřených způsobem předepsaným v článku a vykazujících změny typické pro zkoušenou látku (např. výrobce, velikost částic ap.). Sada spekter představuje informaci, která definuje hranici podobnosti pro danou látku a je vstupním údajem do spektrální databáze používané pro identifikaci této látky. Počet látek v databázi závisí na dané aplikaci.

Soubor spekter uložených v databázi může mít různou formu v závislosti na matematickém zpracování použitém při identifikaci spektra. Mohou to být:
- jednotlivá spektra reprezentující substanci,
- průměrná spektra každé substance s popisem variability.

Během validačního procesu je nutno ověřit schopnost databáze selektivně identifikovat danou látku, a naopak vyloučit ostatní látky v databázi. Tato selektivita musí být pravidelně ověřována, aby bylo zajištěno trvání platnosti databáze; to je obzvláště důležité v případech, kdy dojde k nějakým větším změnám, např. ke změně dodavatele nebo výrobního procesu zkoušené látky.

Databáze je pak platná pouze pro měření na přístroji, na kterém byla vytvořena, a použije-li se pro měření na jiném přístroji, je nutno ověřit, zda přenesená databáze zůstává platná.

Postup stanovení. Vzorek zkoušené látky se připraví stejným způsobem jako pro vytvoření databáze. Spektrum vzorku i referenční spektra změřená v log (1/T) nebo log (1/R) je někdy výhodnější porovnávat po matematické úpravě, např. lze použít druhou derivaci spekter nebo korekci na násobný rozptyl.

Porovnání takovýchto spekter a knihovny referenčních spekter vyžaduje užití vhodné chemometrické klasifikační techniky.

2.3 Zkoušky totožnosti

2.3.1 Zkoušky totožnosti iontů a skupin

Acetyl

Do zkumavky délky asi 180 mm a vnějšího průměru 18 mm se přenese asi 15 mg nebo předepsané množství zkoušené látky a 0,15 ml *kyseliny fosforečné R*. Zkumavka se uzavře zátkou, kterou prochází malá zkumavka délky asi 100 mm a vnějšího průměru 10 mm obsahující *vodu R*, která působí jako chladič. Na povrch malé zkumavky se zavěsí kapka *dusičnanu lanthanitého RS*. Kromě látek těžko hydrolyzovatelných se aparatura postaví do vodní lázně na 5 min, potom se vyjme malá zkumavka a kapka se smíchá na kapkovací desce s 0,05 ml *jodu 0,01 mol/l RS*. K okraji směsi se přidá 0,05 ml *amoniaku zředěného RS2*; po 1 min až 2 min vznikne na styku dvou kapek modré zbarvení, které zesílí a po krátkém čase zmizí.

U látek těžko hydrolyzovatelných se směs pomalu zahřívá k varu nad otevřeným plamenem a potom se postupuje stejně, jak je uvedeno výše.

Alkaloidy

Několik mg nebo předepsané množství zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidává se *kyselina chlorovodíková zředěná RS* do vzniku kyselé reakce (*2.2.4*). Potom se přidá 1 ml *jodobismutitanu draselného RS*; ihned vznikne oranžová nebo oranžově červená sraženina.

Aminy, primární aromatické

Předepsaný roztok se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a přidá se 0,2 ml *dusitanu sodného RS*. Po 1 min až 2 min se přidá 1 ml *2-naftolu RS*; vznikne intenzivní oranžové až červené zbarvení, případně sraženina stejné barvy.

Amoniové soli

K předepsanému roztoku se přidá 0,2 g *oxidu hořečnatého R*. Směs se probublává proudem vzduchu, který ústí k povrchu směsi obsahující 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a 0,05 ml *červeně methylové RS*; zbarvení indikátoru se změní na žluté. Přidá se 1 ml čerstvě připraveného roztoku *hexanitrokobaltitanu sodného R* (100 g/l); vznikne žlutá sraženina.

Amoniové soli a soli těkavých bází

Asi 20 mg zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku. Přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Zahříváním se z roztoku uvolňují páry, které mohou být identifikovatelné svým pachem a zásaditou reakcí (*2.2.4*).

Antimon

Asi 10 mg zkoušené látky se rozpustí mírným zahříváním v 10 ml roztoku obsahujícího 0,5 g *vínanu draselno-sodného R* a nechá se ochladit. K 2 ml tohoto roztoku nebo ke 2 ml předepsaného roztoku se po kapkách přidá *sulfid sodný RS*; vznikne oranžově červená sraženina rozpustná v *hydroxidu sodném zředěném RS*.

Arsen

5 ml předepsaného roztoku se zahřívá na vodní lázni se stejným objemem *zkoumadla fosfornanového R*; vznikne hnědá sraženina.

Barbituráty nesubstituované na dusíku

Asi 5 mg zkoušené látky se rozpustí ve 3 ml *methanolu R*, přidá se 0,1 ml roztoku obsahujícího *dusičnan kobaltnatý R* (100 g/l) a *chlorid vápenatý R* (100 g/l). Promíchá se a za protřepávání se přidá 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*; vznikne fialově modré zbarvení a sraženina.

Benzoany

a) K 1 ml předepsaného roztoku zkoušené látky se přidá 0,5 ml *chloridu železitého RS1*; vznikne sytě žlutá sraženina rozpustná v *etheru R*.

b) Jestliže není předepsáno jinak, převede se 0,2 g zkoušené látky do zkumavky, navlhčí se 0,2 ml až 0,3 ml *kyseliny sírové R* a mírně se zahřívá spodní část zkumavky; na vnitřní straně zkumavky se usazuje bílý sublimát.

c) 0,5 g zkoušené látky se rozpustí v 10 ml *vody R* nebo se použije 10 ml předepsaného roztoku. Přidá se 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*; tvoří se sraženina, která po krystalizaci z *vody R* a vysušení ve vakuu taje při 120 °C až 124 °C (*2.2.14*).

Bismut

a) K 0,5 g zkoušené látky se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* nebo se použije 10 ml předepsaného roztoku. Směs se zahřívá 1 min k varu, nechá se ochladit a v případě potřeby se zfiltruje. K 1 ml takto získaného roztoku se přidá 20 ml *vody R*; vznikne bílá nebo slabě žlutá sraženina, která po přidání 0,05 ml až 0,1 ml *sulfidu sodného RS* se barví hnědě.

b) K asi 45 mg zkoušené látky se přidá 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* nebo se použije 10 ml předepsaného roztoku a 1 min se vaří. Nechá se ochladit a v případě potřeby se zfiltruje. K 5 ml takto získaného roztoku se přidají 2 ml roztoku *thiomočoviny R* (100 g/l); vznikne žlutavě oranžové zbarvení nebo oranžová sraženina. Přidají se 4 ml roztoku *fluoridu sodného R* (25 g/l); po dobu 30 min se roztok neodbarví.

Bromidy

a) Množství zkoušené látky odpovídající asi 3 mg bromidů (Br^-) se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku. Okyselí se *kyselinou dusičnou zředěnou RS*, přidá se 0,4 ml *dusičnanu stříbrného RS1* a po protřepání se nechá stát; vznikne tvarohovitá, světle žlutá sraženina. Po odstřeďování se sraženina rychle promyje třikrát 1 ml *vody R* za chránění před přímým světlem. Supernatantní tekutina nemusí být úplně čirá. Sraženina se suspenduje do 2 ml *vody R* a přidá se 1,5 ml *amoniaku 17,5% RS*; sraženina se těžce rozpouští.

b) Množství zkoušené látky odpovídající asi 5 mg bromidů (Br^-) nebo její předepsané množství se převede do malé zkumavky. Přidá se 0,25 ml *vody R*, asi 75 mg *oxidu olovičitého R*, 0,25 ml *kyseliny octové R* a mírně se protřepe. Horní vnitřní část zkumavky se vysuší kouskem filtračního papíru a směs se ponechá 5 min v klidu. Špička proužku filtračního papíru vhodné velikosti se impregnuje namočením do *fuchsinu RS* a vloží se ihned do zkumavky. Počínaje špičkou vznikne do 10 s fialové zbarvení dobře rozlišitelné od červeného zbarvení fuchsinu, které může být viditelné na horní části papírového proužku.

Citronany

Množství zkoušené látky obsahující asi 50 mg kyseliny citronové se rozpustí v 5 ml *vody R* nebo se použije 5 ml předepsaného roztoku. Přidá se 0,5 ml *kyseliny sírové R* a 1 ml *manganistanu draselného RS* a zahřívá se tak dlouho, dokud barva manganistanu draselného nezmizí. Přidá se 0,5 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (100 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS* a 4 g *kyseliny amidosírové R*. Alkalizuje se po kapkách *amoniakem 26% R* tak dlouho, až se kyselina amidosírová rozpustí. Přidá se nadbytek amoniaku; vzniká fialové zbarvení, které se mění na fialově modré.

Draslík

a) 0,1 g zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku. Přidá se 1 ml *uhličitanu sodného RS* a zahřívá se. Ani po zahřátí, ani po přidání 0,05 ml *sulfidu sodného RS* k ještě horkému roztoku nevznikne sraženina. Po ochlazení v ledové vodě se přidají 2 ml roztoku *kyseliny vinné R* (150 g/l) a nechá se stát; vznikne bílá krystalická sraženina.

b) 40 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *vody R* nebo se použije 1 ml předepsaného roztoku. Přidá se 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 1 ml čerstvě připraveného roztoku *hexanitrokobaltitanu sodného R* (100 g/l); ihned vzniká žlutá nebo oranžově žlutá sraženina.

Dusičnany

Ke směsi 0,1 ml *nitrobenzenu R* a 0,2 ml *kyseliny sírové R* se přidá množství zkoušené upráškované látky odpovídající asi 1 mg dusičnanů (NO_3^-) nebo její předepsané množství. Po 5minutovém stání se ochladí ledovou vodou a pomalu, za neustálého míchání se přidá 5 ml *vody R*, potom 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. Po přidání 5 ml *acetonu R* se protřepe a nechá stát; horní vrstva se zbarví tmavě fialově.

Estery

K asi 30 mg zkoušené látky nebo k jejímu předepsanému množství se přidá 0,5 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (70 g/l) v *methanolu R* a 0,5 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *lihu 96% R*. Zahřívá se k varu, po ochlazení se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a přidá se 0,2 ml desetkrát zředěného *chloridu železitého RS1*; vznikne modravě červené nebo červené zbarvení.

Fosforečnany (orthofosforečnany)

a) 5 ml předepsaného roztoku se v případě potřeby neutralizuje a přidá se 5 ml *dusičnanu stříbrného RS1;* vznikne žlutá sraženina, jejíž barva se varem nezmění. Sraženina se rozpustí po přidání *amoniaku 17,5% R*.

b) 1,0 ml předepsaného roztoku se smíchá s 2 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R*; vzniká žluté zbarvení.

Hliník

Asi 15 mg zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku. Přidá se asi 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a asi 0,5 ml *zkoumadla thioacetamidového R*; sraženina nevznikne. Potom se přidává po kapkách *hydroxid sodný zředě-*

ný RS; tvoří se bílá gelovitá sraženina, která se dalším přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS* rozpouští. Postupně se přidává *chlorid amonný RS;* znovu se tvoří bílá gelovitá sraženina.

Hořčík

Asi 15 mg zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku a přidá se 1 ml *amoniaku zředěného RS1*. Tvoří se bílá sraženina, která se rozpustí po přidání 1 ml *chloridu amonného RS*. Přidá se 1 ml *hydrogenfosforečnanu sodného RS*; tvoří se bílá krystalická sraženina.

Chloridy

a) Zkoušená látka obsahující asi 2 mg chloridů (Cl^-) se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku a okyselí se *kyselinou dusičnou zředěnou RS*. Přidá se 0,4 ml *dusičnanu stříbrného RS1,* protřepe se a nechá stát; vylučuje se tvarohovitá bílá sraženina. Odstřeďuje se a sraženina se rychle promyje třikrát 1 ml *vody R* za chránění před přímým světlem. Supernatantní tekutina nemusí být úplně čirá. Sraženina se suspenduje ve 2 ml *vody R* a přidá se 1,5 ml *amoniaku 17,5% RS*; sraženina se velmi snadno rozpustí, kromě velkých částic, které se rozpouštějí pomaleji.

b) Ke zkoušené látce obsahující asi 15 mg chloridů (Cl^-) nebo k jejímu předepsanému množství se přidá do zkumavky 0,2 g *dichromanu draselného R* a 1 ml *kyseliny sírové R*. Proužek filtračního papíru impregnovaný 0,1 ml *difenylkarbazidu RS* se barví nad otevřenou zkumavkou fialově červeně. Impregnovaný papír nesmí přijít do styku s dichromanem draselným.

Jodidy

a) Množství zkoušené látky obsahující asi 4 mg jodidů (I^-) se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku, okyselí se *kyselinou dusičnou zředěnou RS*, přidá se 0,4 ml *dusičnanu stříbrného RS1*, protřepe se a nechá stát. Vznikne tvarohovitá, světle žlutá sraženina. Odstřeďuje se, sraženina se rychle promyje třikrát 1 ml *vody R* za chránění před přímým světlem. Supernatantní tekutina nemusí být úplně čirá. Sraženina se suspenduje ve 2 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *amoniaku 17,5% RS*; sraženina se nerozpustí.

b) K 0,2 ml roztoku zkoušené látky obsahující asi 5 mg jodidů (I^-) v 1 ml nebo k 0,2 ml předepsaného roztoku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 0,1 ml *dichromanu draselného RS*, 2 ml *vody R* a 2 ml *chloroformu R*. Několik sekund se třepe, potom se nechá stát; chloroformová vrstva se barví fialově nebo fialově červeně.

Křemičitany

Předepsané množství zkoušené látky se v olověném nebo platinovém kelímku pomocí měděného drátku smíchá s asi 10 mg *fluoridu sodného R* a s několika kapkami *kyseliny sírové R* na řídkou kaši. Přikryje se průhlednou plastovou deskou, na jejíž spodní straně visí kapka *vody R*. Mírně se zahřívá a za krátký čas se vytvoří kolem kapky *vody R* bílý prstenec.

Mléčnany

Množství zkoušené látky obsahující asi 5 mg kyseliny mléčné se rozpustí v 5 ml *vody R* nebo se použije 5 ml předepsaného roztoku, přidá se 1 ml *bromové vody R* a 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Zahřívá se na vodní lázni do odbarvení a opatrně se míchá skleněnou tyčinkou. Přidají

se 4 g *síranu amonného R* a promíchá se. Po kapkách a bez míchání se přidá 0,2 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (100 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS*, potom se bez míchání přidá 1 ml *amoniaku 26% RS* a nechá se 30 min stát; na rozhraní dvou kapalin se objeví tmavozelený prstenec.

Octany

a) Zkoušená látka se zahřívá se stejným množstvím *kyseliny šťavelové R*. Uvolňují se páry s charakteristickým pachem kyseliny octové, které dávají kyselou reakci (*2.2.4*).

b) Asi 30 mg zkoušené látky se rozpustí ve 3 ml *vody R* nebo se použijí 3 ml předepsaného roztoku. Přidá se postupně 0,25 ml *dusičnanu lanthanitého RS*, 0,1 ml *jodu 0,1 mol/l RS*, 0,05 ml *amoniaku zředěného RS2* a zahřívá se opatrně k varu; během několika minut vznikne modrá sraženina nebo tmavě modré zbarvení.

Olovo

a) 0,1 g zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* nebo se použije 1 ml předepsaného roztoku a přidají se 2 ml *chromanu draselného RS*; tvoří se žlutá sraženina, která se rozpustí po přidání 2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

b) 50 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* nebo se použije 1 ml předepsaného roztoku, přidá se 10 ml *vody R* a 0,2 ml *jodidu draselného RS*; tvoří se žlutá sraženina, která se zahříváním k varu po dobu 1 min až 2 min rozpustí. Po ochlazení se sraženina tvoří znovu v podobě lesklých žlutých destiček.

Rtuť

a) 0,1 ml roztoku zkoušené látky se kápne na oškrabaný, lesklý měděný plíšek. Tvoří se tmavě šedá skvrna, která třením zjasní. Plíšek se vysuší a zahřívá ve zkumavce; skvrna zmizí.

b) K předepsanému roztoku se přidá *hydroxid sodný zředěný RS* do silně alkalické reakce (*2.2.4*); tvoří se hustá žlutá sraženina (soli rtuťnaté).

Salicylany

a) K 1 ml předepsaného roztoku se přidá 0,5 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne fialové zbarvení, které se přidáním 0,1 ml *kyseliny octové R* nezmění.

b) 0,5 g zkoušené látky se rozpustí v 10 ml *vody R* nebo se použije 10 ml předepsaného roztoku a přidá se 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Vzniklá sraženina po překrystalizování z horké *vody R* a vysušení ve vakuu taje při 156 °C až 161 °C (*2.2.14*).

Sírany

a) Asi 45 mg zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R* nebo se použije 5 ml předepsaného roztoku. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 1 ml *chloridu barnatého RS1;* vznikne bílá sraženina.

b) K suspenzi získané zkouškou a) se přidá 0,05 ml *jodu 0,1 mol/l RS*. Suspenze zůstává žlutá (rozdíl od siřičitanů a hydrogensiřičitanů), ale odbarvuje se, jestliže se po kapkách přidává *chlorid cínatý RS* (rozdíl od jodičnanů). Směs se povaří; barevná sraženina nevzniká (rozdíl od selenanů a wolframanů).

Sodík

a) Asi 0,1 g zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *vody R* nebo se použijí 2 ml předepsaného roztoku. Přidají se 2 ml roztoku *uhličitanu draselného R* (150 g/l) a zahřívá se k varu. Sraženina se netvoří. Přidají se 4 ml *hexahydroxoantimoničnanu draselného RS* a zahřívá se k varu. Ochladí se v ledové vodě a dle potřeby se tře vnitřní stěna zkumavky tyčinkou; tvoří se hustá bílá sraženina.

b) Množství zkoušené látky obsahující asi 2 mg sodíku (Na^+) se rozpustí v 0,5 ml *vody R* nebo se použije 0,5 ml předepsaného roztoku, přidá se 1,5 ml *zkoumadla methoxyfenyloctového R* a 30 min se chladí v ledové vodě. Tvoří se objemná bílá krystalická sraženina, která se nerozpustí ve *vodě R* při 20 °C ani po pětiminutovém míchání. Přidá se 1,0 ml *amoniaku zředěného RS1*; sraženina se rozpustí a ani po přidání 1 ml *uhličitanu amonného RS* znovu nevznikne.

Stříbro

Asi 10 mg zkoušené látky se rozpustí v 10 ml *vody R* nebo se použije 10 ml předepsaného roztoku a přidá se 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*; vzniká tvarohovitá bílá sraženina, která se rozpustí po přidání 3 ml *amoniaku zředěného RS1*.

Uhličitany a kyselé uhličitany

K suspenzi 0,1 g zkoušené látky ve 2 ml *vody R* nebo k 2 ml předepsaného roztoku se přidají 3 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Zkumavka se rychle uzavře provrtanou zátkou, ve které je skleněná trubička ohnutá dvakrát do pravého úhlu. Roztok šumí, vyvíjí se plyn bez barvy a pachu. Po mírném nahřátí se plyn zavádí do 5 ml *hydroxidu barnatého RS;* tvoří se bílá sraženina, která se rozpouští po přidání nadbytku *kyseliny chlorovodíkové RS*.

Vápník

a) K 0,2 ml neutrálního roztoku zkoušené látky obsahujícího asi 0,2 mg vápníku (Ca^{2+}) v 1 ml nebo k 0,2 ml předepsaného roztoku se přidá 0,5 ml *glyoxalbishydroxyanilu R* (2 g/l) v *lihu 96% R*, 0,2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,2 ml *uhličitanu sodného RS*. Protřepe se s 1 ml až 2 ml *chloroformu R* a přidá se 1 ml až 2 ml *vody R*; chloroformová vrstva se zbarví červeně.

b) Asi 20 mg zkoušené látky nebo její předepsané množství se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové R* a přidá se 0,5 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS*; roztok zůstane čirý. Po přidání asi 50 mg *chloridu amonného R* vzniká bílá krystalická sraženina.

Vínany

a) Asi 15 mg zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R* nebo se použije 5 ml předepsaného roztoku. Přidá se 0,05 ml roztoku *síranu železnatého R* (10 g/l) a 0,05 ml *peroxidu vodíku RS*; vznikne nestálé žluté zabarvení. Po vymizení zabarvení se po kapkách přidává *hydroxid sodný zředěný RS*; vznikne intenzivní modré zbarvení.

b) K 0,1 ml roztoku zkoušené látky obsahujícího asi 15 mg kyseliny vinné v 1 ml nebo k 0,1 ml předepsaného roztoku se přidá 0,1 ml roztoku *bromidu draselného R* (100 g/l), 0,10 ml roztoku *resorcinolu R* (20 g/l) a 3 ml *kyseliny sírové R*. Zahřívá se na vodní lázni 5 min až 10 min; vznikne tmavě modré zbarvení. Nechá se ochladit a roztok se naleje do *vody R*; zbarvení se změní na červené.

Xanthiny

K několika mg zkoušené látky nebo k jejímu předepsanému množství se přidá 0,1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Odpařuje se na vodní lázni do sucha, až se objeví žlutavě červený zbytek. Přidá se 0,1 ml *amoniaku zředěného RS2*; zbarvení zbytku se změní na fialově červené.

Zinek

0,1 g zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R* nebo se použije 5 ml předepsaného roztoku. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* vznikne bílá sraženina, která se po přidání dalších 2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* rozpustí. Přidá se 10 ml *chloridu amonného RS;* roztok zůstává čirý. Přidá se 0,1 ml *sulfidu sodného RS;* tvoří se vločkovitá bílá sraženina.

Železo

a) Množství zkoušené látky obsahující asi 10 mg železa (Fe^{2+}) se rozpustí v 1 ml *vody R* nebo se použije 1 ml předepsaného roztoku. Přidá se 1 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného RS*; tvoří se modrá sraženina, která se nerozpouští v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS.*

b) Množství zkoušené látky obsahující asi 1 mg železa (Fe^{3+}) se rozpustí ve 30 ml *vody R*. Ke 3 ml tohoto roztoku nebo ke 3 ml předepsaného roztoku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 1 ml *thiokyanatanu draselného RS*; roztok se zbarví červeně. Z roztoku se oddělí dvě části, každá obsahuje 1 ml. K první části takto získaného roztoku se přidá 5 ml *isoamylalkoholu R* nebo *etheru R*, protřepe se a nechá se stát; organická vrstva se zbarví růžově. K druhé části roztoku se přidají 2 ml *chloridu rtuťnatého RS;* červené zbarvení zmizí.

c) Množství zkoušené látky obsahující nejméně 1 mg železa (Fe^{3+}) se rozpustí v 1 ml *vody R* nebo se použije 1 ml předepsaného roztoku. Přidá se 1 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS*; tvoří se modrá sraženina, která se přidáním 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* nerozpouští.

2.3.2 Totožnost mastných olejů tenkovrstvou chromatografií

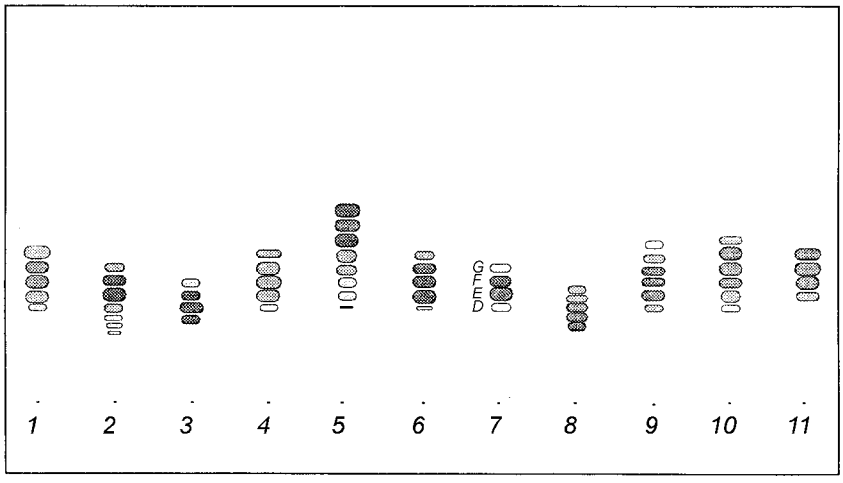
Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu pro vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografii.

Zkoušený roztok. Není-li předepsáno jinak, rozpustí se asi 20 mg (1 kapka) mastného oleje ve 3 ml *dichlormethanu R.*

Porovnávací roztok. Rozpustí se asi 20 mg (1 kapka) *oleje kukuřičného R* ve 3 ml *dichlormethanu R.*

Na vrstvu se nanese po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se dvakrát *etherem R* po dráze 0,5 cm. Pak se vyvíjí dvakrát směsí objemových dílů *dichlormethanu R*, *kyseliny octové ledové R* a *acetonu R* (20 + 40 + 50) po dráze 8 cm. Vrstva se vysuší volně na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, zahřívá se 3 min při 120 °C a pozoruje se v denním světle.

Na chromatogramu jsou charakteristické skvrny odpovídající obrázku 2.3.2-1.



Obr. 2.3.2-1 Charakteristické chromatogramy k určení totožnosti mastných olejů

1. Maydis oleum	2. Arachidis oleum	3. Cacao oleum
4. Sesami oleum	5. Lini oleum	6. Amygdalae oleum
7. Olivae oleum	8. Rapae oleum	9. Rapae oleum (sine acido erucico)
10. Sojae oleum	11. Helianthi oleum	

2.3.3 Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií

Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *křemeliny G R* impregnované následovně.

Deska s vrstvou se postaví v uzavřené chromatografické komoře do potřebného množství směsi obsahující *fenoxyethanol R* 10 % (*V/V*) a *makrogol 300 R* (50 g/l) v *acetonu R* tak, aby vrstva byla ponořena asi 5 mm pod povrch směsi. Když impregnační směs dosáhne nejméně 17 cm od spodního okraje vrstvy, deska s vrstvou se vyjme a ihned se použije. Vyvíjení chromatogramů při zkoušce se provede ve stejném směru jako impregnace.

Zkoušený roztok. 20 mg zkoušené látky se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 20 mg odpovídající referenční látky (CRL) se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanesou 2 μl každého roztoku a vyvíjí se ve tmě po dráze 15 cm směsí objemových dílů *etheru petrolejového R* a *diethylaminu R* (50 + 1) nasycenou *fenoxyethanolem R* (tj. 3 ml až 4 ml *fenoxyethanolu R* se přidají k výše uvedené směsi rozpouštědel, protřepe se a po oddělení se použije horní vrstva, i když je zakalená). Po vyjmutí z komory se vrstva vystaví na několik minut působení ultrafialového světla při 365 nm a potom se hodnotí.

Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, fluorescencí a velikostí se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká roztokem *kyseliny sírové R* 10% (*V/V*) v *lihu 96% R*. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje zbarvením se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. Zbarvení skvrn je stálé po dobu nejméně 20 min.

2.3.4 Pach

0,5 g až 2,0 g zkoušené látky se rozetřou v tenké vrstvě na hodinové sklíčko o průměru 6 cm až 8 cm. Po 15 min se určí pach nebo se ověří jeho nepřítomnost.

2.4 Limitní zkoušky

2.4.1 Amonium

Jestliže není předepsáno jinak, použije se metoda A.

Metoda A

Předepsané množství zkoušené látky se ve zkumavce rozpustí ve 14 ml *vody R*, je-li potřeba, upraví se pH roztoku do alkalické reakce přidáním *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. K roztoku se přidá 0,3 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS*. Současně se připraví porovnávací roztok za použití 10 ml základního *roztoku amonia (1 μg-NH_4/ml)*, 5 ml *vody R* a 0,3 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS*. Zkumavky se uzavřou.

Po 5 min se zkoušený roztok nezbarví intenzivněji žlutě než současně připravený porovnávací roztok.

Metoda B

Předepsané množství jemně upráškované zkoušené látky se ve vhodné 25ml skleněné nádobce s polyethylenovým uzávěrem rozpustí nebo suspenduje v 1 ml *vody R* a přidá se 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R*. Pod uzávěr se umístí *papír se síranem manganatým a dusičnanem stříbrným R* velikosti 5 mm^2 navlhčený několika kapkami *vody R* a ihned se uzavře. Opatrně se promíchá krouživým pohybem tak, aby tekutina nevystříkla, a nechá se 30 min stát při 40 °C.

Jestliže se *papír se síranem manganatým a dusičnanem stříbrným R* zbarví šedě, není toto zbarvení intenzivnější než zbarvení *papíru se síranem manganatým a dusičnanem stříbrným R* u porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití předepsaného objemu základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)*, 1 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R*.

2.4.2 Arsen

Metoda A

Přístroj na stanovení arsenu, viz obr. 2.4.2-1, se skládá ze 100ml kuželové baňky se zabroušenou skleněnou zátkou, kterou prochází skleněná trubice délky 200 mm a vnitřního průměru 5 mm. Spodní část této trubice je zúžena na vnitřní průměr 1,0 mm a 15 mm od jejího konce je otvor, který je umístěn nejméně 3 mm pod spodním okrajem zátky a má průměr 2 mm až 3 mm. Horní část této trubice je zakončena dokonale rovnou plochou kolmou k ose. K této části je přiložena 30 mm dlouhá skleněná trubice o stejném průměru a se stejně upraveným zakončením. Obě části jsou k sobě přitisknuty pomocí dvou spirálových pružin. Ve spodní trubici je vloženo 50 mg až 60 mg *vaty s octanem olovnatým R* nebo 50 mg až 60 mg stočeného proužku *papíru s octanem olovnatým R*, který je umístěn na malé vatové zátce. Do prostoru mezi skleněnými trubicemi se vloží kolečko nebo čtvereček *papíru s bromidem rtuťnatým R* tak, aby byl zakryt otvor trubice (15 mm x 15 mm).

Předepsané množství zkoušené látky se v kuželové baňce rozpustí ve 25 ml *vody R* nebo se předepsané množství roztoku zředí *vodou R* na 25 ml. Přidá se 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 0,1 ml *chloridu cínatého RS* a 5 ml *jodidu draselného RS*. Po 15min stání se přidá 5 g *zinku*

aktivovaného R, ihned se spojí obě části přístroje a kuželová baňka se ponoří do vodní lázně o teplotě, která umožňuje udržovat stejnoměrný vývoj plynu.

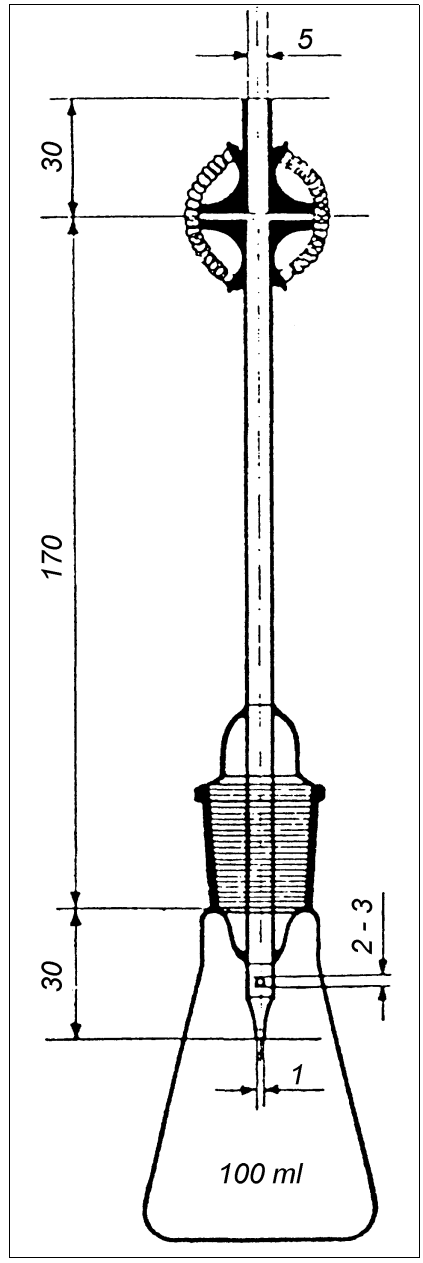
Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 1 ml základního *roztoku arsenu (1 µg As/ml)* zředěného *vodou R* na 25 ml.

Nejdříve po dvou hodinách se porovnají skvrny zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku vzniklé na *papíru s bromidem rtuťnatým R*. Skvrna zkoušeného roztoku není intenzivněji zbarvena než skvrna porovnávacího roztoku.

Metoda B

Do zkumavky se 4 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a asi 5 mg *jodidu draselného R* se přidá předepsané množství zkoušené látky a 3 ml *zkoumadla fosfornanového R*. Směs se zahřívá 15 min na vodní lázni za občasného protřepání. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 0,5 ml základního *roztoku arsenu (10 µg As/ml)*.

Po zahřátí na vodní lázni není zbarvení zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.



Obr. 2.4.2-1 Přístroj pro limitní zkoušku A na arsen
Rozměry v milimetrech

2.4.3 Vápník

Všechny roztoky použité v této zkoušce se připravují z vody destilované R.

K 0,2 ml základního *roztoku vápníku (100 µg Ca/ml) v lihu* se přidá 1 ml *šťavelanu amonného RS*. Po 1 min se přidá směs 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 15 ml roztoku obsahujícího předepsané množství zkoušené látky a protřepe se.

Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití směsi 10 ml základního *roztoku vápníku (10 µg Ca/ml)*, 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 5 ml *vody destilované R*.

Po 15 min se zkoušený roztok nezakalí intenzivněji než porovnávací roztok.

2.4.4 Chloridy

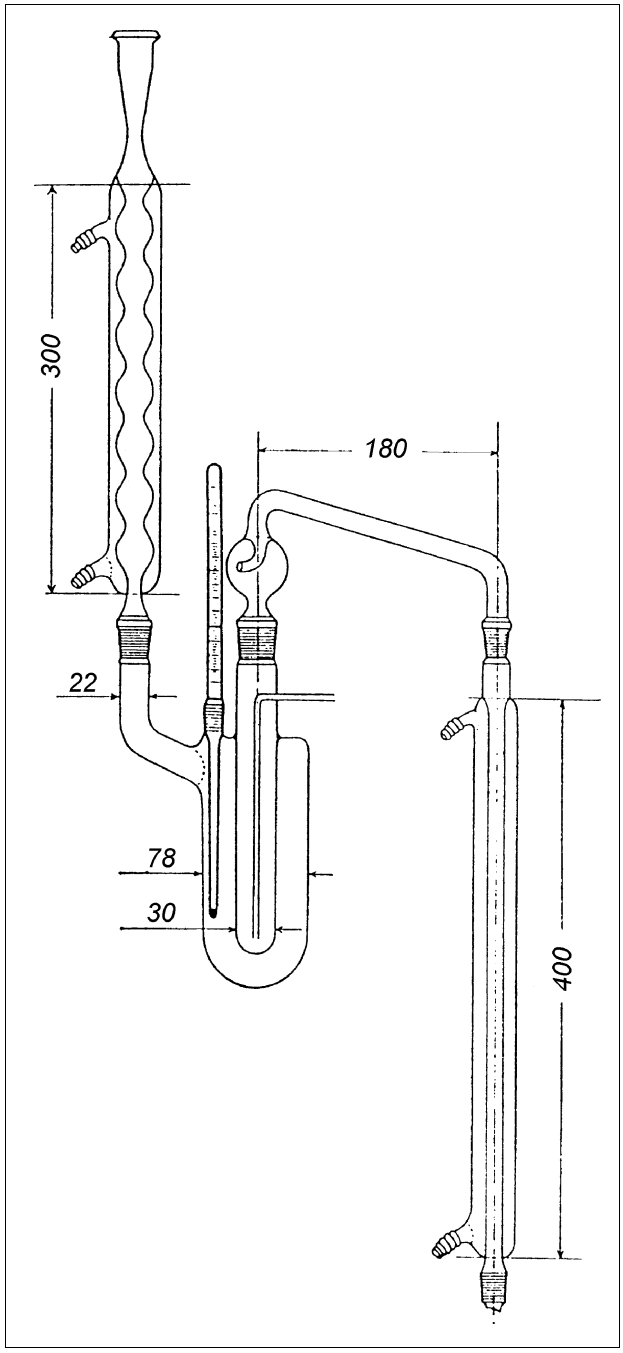
K 15 ml zkoušeného roztoku se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a směs se najednou přelije do zkumavky obsahující 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2*.

Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 10 ml základního *roztoku chloridů (5 µg Cl/ml)* a 5 ml *vody R*. Roztoky se nechají stát za chránění před světlem.

Po 5 min zkoušený roztok neopalizuje nebo se nezakalí intenzivněji než porovnávací roztok. Opalescence nebo zákal se pozoruje ze strany proti černému matnému pozadí.

2.4.5 Fluoridy

Do vnitřní zkumavky přístroje na stanovení fluoridů, viz obrázek 2.4.5-1, se vpraví předepsané množství zkoušené látky, 0,1 g kyselinou promytého *písku R* a 20 ml směsi složené ze stejných objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R*. Pak se zahřeje vnější zkumavka obsahující *tetrachlorethan R* k varu (146 °C) a při této teplotě se udržuje.



Obr. 2.4.5-1 Přístroj pro limitní zkoušku na fluoridy
Rozměry v milimetrech

Zahřívá se vyvíječ páry, destiluje se a destilát se zachytává ve 100ml odměrné baňce obsahující 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Během destilace se ve vnitřní zkumavce udržuje konstantní objem (20 ml) a zajistí se v případě potřeby přídavkem *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS,* aby destilát zůstal alkalický. Destilát se zředí *vodou R* na 100 ml (zkoušený roztok).

Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 5 ml základního *roztoku fluoridů (10 μg F/ml)* místo zkoušené látky. Do dvou skleněných odměrných válců se zabroušenou skleněnou zátkou se vpraví po 20 ml zkoušeného a porovnávacího roztoku a po 5 ml *zkoumadla aminomethylalizarindioctového R.*

Po 20 min se zkoušený roztok nezbarví intenzivněji modře (původní zbarvení je červené) než porovnávací roztok.

2.4.6 Hořčík

K 10 ml předepsaného roztoku se přidá 0,1 g *tetraboritanu sodného R*. Jestliže je třeba, upraví se pH roztoku na 8,8 až 9,2 *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* nebo *hydroxidem sodným zředěným RS*. Potom se roztok převede do dělicí nálevky a vytřepává se postupně dvakrát vždy po dobu 1 min 5 ml roztoku *hydroxychinolinu R* (1 g/l) v *chloroformu R* a nechá se oddělit. Po oddělení se organická vrstva odstraní a k vodné vrstvě se přidá 0,4 ml *butylaminu R* a 0,1 ml *triethanolaminu R*. Jestliže je třeba, upraví se pH roztoku na 10,5 až 11,5, pak se přidají 4 ml roztoku *hydroxychinolinu R* (1 g/l) v *chloroformu R*, opět se vytřepává po dobu 1 min a nechá se oddělit. K hodnocení se použije spodní vrstva.

Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 1 ml základního *roztoku hořčíku (10 μg Mg/ml)* a 9,0 ml *vody R*.

Zkoušený roztok se nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok.

2.4.7 Hořčík a kovy alkalických zemin

Ke 200 ml *vody R* se přidá 0,1 g *hydroxylamoniumchloridu R*, 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0*, 1 ml *síranu zinečnatého 0,1 mol/l VS* a asi 15 mg *černi eriochromové T s chloridem sodným R*. Zahřeje se asi na 40 °C a titruje se *edetanem disodným 0,01 mol/l VS* z fialového do jasně modrého zbarvení. Pak se přidá předepsané množství zkoušené látky rozpuštěné ve 100 ml *vody R* nebo předepsané množství zkoušeného roztoku. Jestliže se zbarvení roztoku po přidání zkoušené látky změnilo zpět na fialové, titruje se dále *edetanem disodným 0,01 mol/l VS* opět do modrého zbarvení.

Spotřeba roztoku *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* při druhé titraci není vyšší, než je předepsáno.

2.4.8 Těžké kovy

Metoda A

Ke 12 ml předepsaného vodného roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a směs se ihned promíchá (zkoušený roztok). Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 10 ml základního *roztoku olova (1 μg nebo 2 μg Pb/ml)*, jak je předepsáno, a přidají se 2 ml zkoušeného roztoku. Současně se připraví kontrolní roztok za

použití 10 ml *vody R* a 2 ml zkoušeného roztoku. V porovnání s kontrolním roztokem vykazuje porovnávací roztok slabě hnědé zbarvení.

Po 2 min hnědé zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

Metoda B

Zkoušená látka se rozpustí v organickém rozpouštědle obsahujícím minimální procento vody (např. dioxan obsahující 15 % vody nebo aceton obsahující 15 % vody).

Ke 12 ml předepsaného roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5*. Promíchá se a přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového* a směs se ihned promíchá (zkoušený roztok). Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 10 ml *roztoku olova (1 μg nebo 2 μg Pb/ml)*, jak je předepsáno, a 2 ml zkoušeného roztoku. Roztok olova (1 μg nebo 2 μg Pb/ml) se připraví zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* rozpouštědlem použitým pro zkoušenou látku.

Současně se připraví kontrolní roztok smícháním 10 ml použitého rozpouštědla a 2 ml zkoušeného roztoku. V porovnání s kontrolním roztokem vykazuje porovnávací roztok slabě hnědé zbarvení.

Po 2 min není hnědé zbarvení zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

Metoda C

Předepsané množství zkoušené látky (nejvýše 2 g) se převede do křemenného kelímku se 4 ml roztoku *síranu hořečnatého R (250 g/l)* v *kyselině sírové zředěné RS*. Směs se promíchá tenkou skleněnou tyčinkou a opatrně se zahřívá, až se směs roztaví. Jestliže je směs tekutina, šetrně se odpaří do sucha na vodní lázni. Za stoupající teploty se zahřívá a spaluje tak dlouho, až je zbytek bílý nebo pouze slabě šedý. Spalování se provádí při teplotě nepřevyšující 800 °C. Po vychladnutí se zbytek zvlhčí několika kapkami *kyseliny sírové zředěné RS*, odpaří se, znovu se spálí a nechá vychladnout. Doba spalování nesmí přesáhnout 2 hod. Zbytek se převede dvakrát 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do zkumavky. Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a *amoniak 26% R* do vzniku růžového zbarvení. Po ochlazení se přidá *kyselina octová ledová R* do odbarvení a ještě navíc 0,5 ml. Je-li potřeba, zfiltruje se a filtr se promyje. Zředí se *vodou R* na 20 ml. Ke 12 ml takto získaného roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a směs se promíchá. Přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se promíchá (zkoušený roztok).

Současně se připraví porovnávací roztok za použití 4 ml roztoku *síranu hořečnatého R* (250 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS* a předepsaného objemu základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*. Stejným způsobem, jako je předepsáno u zkoušeného roztoku, se spálí, rozpustí v kyselině chlorovodíkové, přidá se roztok amoniaku, kyselina octová a zředí se *vodou R* na 20 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml zkoušeného roztoku, 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a promíchá se. Přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se promíchá.

Současně se připraví kontrolní roztok smícháním 10 ml *vody R* a 2 ml zkoušeného roztoku. V porovnání s kontrolním roztokem vykazuje porovnávací roztok slabě hnědé zbarvení.

Po 2 min není hnědé zbarvení zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

Metoda D

Do křemenného kelímku se naváží předepsané množství zkoušené látky a smíchá se s 0,5 g *oxidu hořečnatého R1*. Žíhá se do slabě červeného žáru, až vznikne homogenní bílá nebo šedobílá hmota. Pokud ještě po 30 min spalování zůstává směs barevná, nechá se vychladnout, promíchá se tenkou skleněnou tyčinkou a spalování se opakuje. Je-li nutné, postup se opakuje. Dále se žíhá asi 1 h při 800 °C. Zbytek se převede dvakrát 5 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS* a *vody R* do zkumavky. Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu R* a roztok *amoniaku 26% R* do růžového zbarvení. Po ochlazení se přidá *kyselina octová ledová R* do odbarvení a ještě 0,5 ml navíc. Je-li potřeba, zfiltruje se a filtr se promyje. Zředí se *vodou R* na 20 ml. Ke 12 ml takto získaného roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a promíchá se. Přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se promíchá (zkoušený roztok).

Porovnávací roztok se připraví následujícím postupem. K 0,5 g *oxidu hořečnatého R1* se přidá předepsané množství základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)* a vysuší se při 100 °C až 105 °C v sušárně. Stejným způsobem, jako je předepsáno u zkoušeného roztoku, se spálí, přidá se kyselina chlorovodíková, roztok amoniaku, kyselina octová a zředí se *vodou R* na 20 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml zkoušeného roztoku, 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a promíchá se. Přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se promíchá.

Současně se připraví kontrolní roztok smícháním 10 ml *vody R* a 2 ml zkoušeného roztoku. V porovnání s kontrolním roztokem vykazuje porovnávací roztok slabě hnědé zbarvení.

Po 2 min není hnědé zbarvení zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

Metoda E

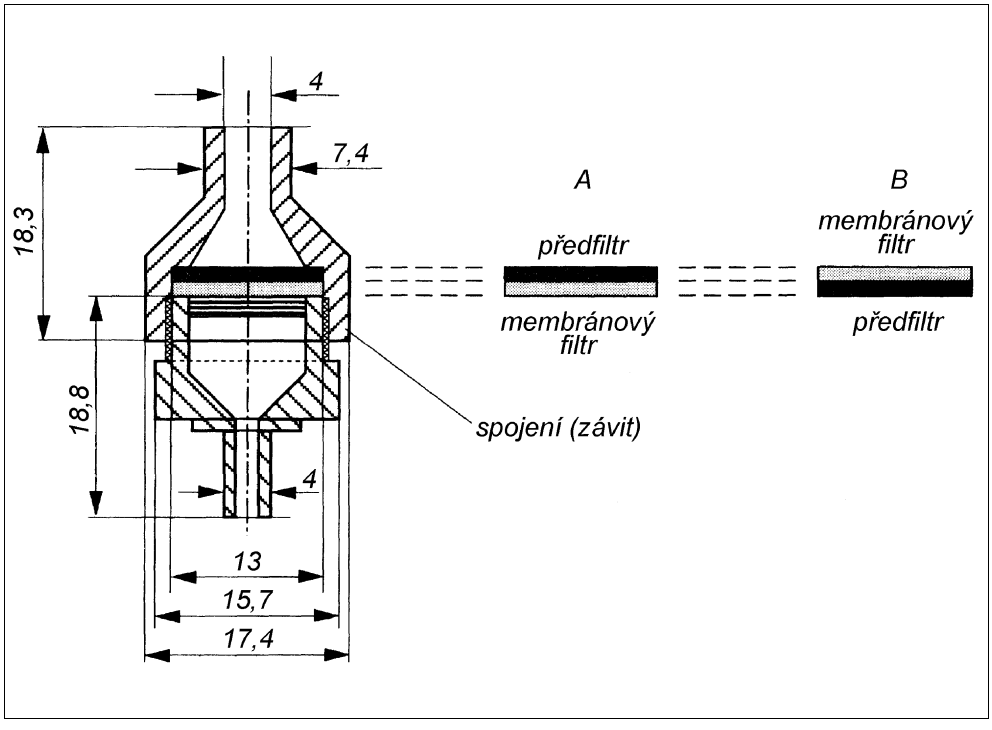
Předepsané množství zkoušené látky se rozpustí ve 30 ml *vody R* nebo v jiném předepsaném objemu. Filtrační zařízení se připraví z válce 50ml injekční stříkačky bez pístu připojením k nástavci, v němž na rovné ploše je membránový filtr (rozměr pórů 3 μm) a na něm předfiltr, viz obr. 2.4.8-1A.

Zkoušeným roztokem se naplní válec injekční stříkačky, vloží se píst a jeho stlačením se všechna tekutina zfiltruje. Po otevření podložky a odejmutí předfiltru se zkontroluje membránový filtr. Je-li znečištěn, vymění se za nový a postup se opakuje stejným způsobem.

K předfiltrátu nebo k předepsanému objemu předfiltrátu se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R*. Po promíchání se nechá 10 min stát a znovu se zfiltruje stejným způsobem. Filtry při této filtraci jsou umístěny opačně, na rovné ploše předfiltr a na něm membránový filtr, viz obr. 2.4.8-1B. Filtrace se provádí pomalu a rovnoměrně mírným a stálým tlakem na píst injekční stříkačky. Po skončení filtrace se podložka otevře, membránový filtr se vyjme a usuší pomocí filtračního papíru.

Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití předepsaného objemu základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Zbarvení skvrny na membránovém filtru zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení skvrny na membránovém filtru porovnávacího roztoku.



Obr. 2.4.8.-1 Zařízení pro limitní zkoušku na těžké kovy (metoda E)
Rozměry v milimetrech

A - předfiltrace roztoku
B - filtrace roztoku po přidání zkoumadel

2.4.9 Železo

Předepsané množství zkoušené látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml nebo se použije 10 ml předepsaného roztoku. Přidají se 2 ml roztoku *kyseliny citronové R* (200 g/l) a 0,1 ml *kyseliny thioglykolové R*. Promíchá se, zalkalizuje se *amoniakem 17,5% RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml (zkoušený roztok). Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 10 ml základního roztoku železa (1 μg Fe/ml).

Po 5 min není růžové zbarvení zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

2.4.10 Olovo v cukrech

Stanovení olova se provede atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 20,0 g zkoušené látky se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *vody R* a touto směsí se zředí na 100,0 ml. Přidají se 2,0 ml nasyceného roztoku *pyrrolidinyldithiokarbamatu amonného R* (asi 10 g/l) a 10,0 ml *isobutylmethylketonu R* a potom se 30 s třepe, přičemž se směs chrání před světlem. Po oddělení vrstev se dále použije vrstva isobutylmethylketonu.

Porovnávací roztoky. Tři porovnávací roztoky se připraví stejným způsobem jako zkoušený roztok s tím rozdílem, že se k 20,0 g zkoušené látky navíc přidá 0,5 ml, 1,0 ml a 1,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Nulová poloha přístroje se nastaví pomocí *isobutylmethylketonu R*, který byl připraven stejným způsobem jako zkoušený roztok bez zkoušené látky. Měří se absorbance roztoků při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Zkoušená látka obsahuje nejvýše 0,5 μg Pb/g, není-li uvedeno jinak.

2.4.11 Fosforečnany

Ke 100 ml zkoušeného roztoku připraveného a v případě potřeby zneutralizovaného tak, jak je předepsáno v jednotlivých článcích, se přidají 4 ml *molybdenan-kyseliny sírové RS3*. Protřepe se a přidá se 0,1 ml *chloridu cínatého RS1*.

Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku fosforečnanů (5 μg PO_4/ml)* a 98 ml *vody R*. Po 10 min se hodnotí zbarvení 20 ml každého roztoku.

Zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku.

2.4.12 Draslík

K 10 ml předepsaného roztoku se přidají 2 ml čerstvě připraveného roztoku *tetrafenylboritanu sodného R* (10 g/l).

Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 5 ml základního *roztoku draslíku (20 μg K/ml)* a 5 ml *vody R*.

Po 5 min zkoušený roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok.

2.4.13 Sírany

Všechny roztoky použité v této zkoušce se připravují z vody destilované R.

K 1,5 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml) (1)* se přidá 1 ml roztoku *chloridu barnatého R* (250 g/l). Protřepe se a nechá se 1 min stát. Pak se přidá 15 ml zkoušeného roztoku a 0,5 ml *kyseliny octové R*. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 15 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* místo zkoušeného roztoku.

Po 5 min zkoušený roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok.

2.4.14 Síranový popel

Křemenný nebo platinový kelímek se žíhá 30 min do červeného žáru, nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se. Zkoušená látka se naváží do kelímku, přidají se 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, zahřívá se nejdříve na vodní lázni, pak opatrně nad plamenem a potom postupně až do asi 600 °C. V zahřívání se pokračuje, až zmizí všechny černé částice. K vychladlému zbytku se přidá několik kapek *kyseliny sírové zředěné RS* a stejným způsobem se znovu zahřívá a spaluje. K vychladlému zbytku se přidá několik kapek *uhličitanu amonného RS*, odpaří se, opatrně se žíhá, nechá se vychladnout, zváží se a žíhání se opakuje po 15 min až do konstantní hmotnosti.

2.4.15 Nikl v polyolech

Stanovení niklu se provede atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 20,0 g zkoušené látky se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *vody R* a touto směsí se zředí na 100,0 ml. Přidají se 2,0 ml nasyceného roztoku *pyrrolidinyldithiokarbamatu amonného R* (asi 10 g/l) a 10,0 ml *isobutylmethylketonu R* a potom se 30 s třepe za chránění před světlem. Po oddělení vrstev se dále použije vrstva isobutylmethylketonu.

Porovnávací roztoky. Tři porovnávací roztoky se připraví stejným způsobem jako zkoušený roztok s tím rozdílem, že se k 20,0 g zkoušené látky navíc přidá 0,5 ml, 1,0 ml a 1,5 ml základního *roztoku niklu (10 μg Ni/ml*).

Nulová poloha přístroje se nastaví pomocí *isobutylmethylketonu R*, připraveného stejným způsobem jako zkoušený roztok bez zkoušené látky. Měří se absorbance při 232,0 nm za použití niklové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Zkoušená látka obsahuje nejvýše 1 μg Ni/g, není-li uvedeno jinak.

2.4.16 Celkový popel

Křemenný nebo platinový kelímek se žíhá 30 min do červeného žáru, nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se. Není-li předepsáno jinak, naváží se do kelímku 1,000 g zkoušené látky nebo upráškované rostlinné drogy. Kelímek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C a potom se žíhá do konstantní hmotnosti v muflové peci při (600 ± 25) °C. Po každém žíhání se nechá vychladnout v exsikátoru. Během zkoušky se nemá objevit plamen. Pokud ještě po opakovaném žíhání obsahuje popel černé částice, přidá se horká *voda R*, přefiltruje se přes bezpopelný filtrační papír a papír se zbytkem se spálí a vyžíhá. K popelu se přidá filtrát, opatrně se odpaří do sucha a vyžíhá do konstantní hmotnosti.

2.4.17 Hliník

Stanoví se fluorimetrickou metodou (*2.2.21*).

Zkoušený roztok. Předepsaný roztok se v dělicí nálevce protřepe dvakrát s 20 ml a potom jednou s 10 ml roztoku *hydroxychinolinu R* (5 g/l) v *chloroformu R.* Spojené chloroformové roztoky se převedou do odměrné baňky a zředí se *chloroformem R* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. Za použití předepsaného roztoku se postupuje stejně jako u zkoušeného roztoku.

Kontrolní roztok. Za použití předepsaného roztoku se postupuje stejně jako u zkoušeného roztoku.

Měří se intenzita fluorescence (*2.2.21*) zkoušeného roztoku (I_1), porovnávacího roztoku (I_2) a kontrolního roztoku (I_3) za použití excitačního záření o vlnové délce 392 nm a sekundárního filtru s maximem propustnosti při 518 nm nebo s monochromátorem nastaveným na tuto vlnovou délku.

Fluorescence (I_1 - I_3) zkoušeného roztoku není větší než fluorescence (I_2 - I_3) porovnávacího roztoku.

2.4.18 Volný formaldehyd

Pokud není předepsáno jinak, použije se Metoda A. Metoda B je vhodná pro vakcíny, ke kterým byl přidán disiřičitan sodný k neutralizaci nadbytku formaldehydu.

Metoda A

1,0 ml humánní vakcíny se zředí předepsaným rozpouštědlem na 10,0 ml. 1,0 ml veterinárního bakteriálního toxoidu se zředí předepsaným rozpouštědlem na 25,0 ml (zkoušený roztok).

K 1 ml zkoušeného roztoku se přidají 4 ml *vody R* a 5 ml *acetylacetonu RS1* a zkumavka s roztokem se ponechá 40 min ve vodní lázni při 40 °C.

Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 1 ml zředěného *formaldehydu RS* obsahujícího 20 μg formaldehydu (CH_2O) v 1 ml místo zředěné vakcíny. Hodnotí se zkumavky ve směru jejich vertikální osy.

Metoda B

1,0 ml zkoušené vakcíny se zředí předepsaným rozpouštědlem na 100,0 ml. K 0,5 ml této zředěné vakcíny se přidá 5 ml roztoku *methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu R* (0,5 g/l) a 0,05 ml *polysorbátu 80 R*. Zkumavka se uzavře, protřepe a nechá stát 60 min. Po přidání 1 ml *zkoumadla chlorid železitý-kyselina amidosírová R* se nechá stát dalších 15 min. Potom se měří absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku při 628 nm proti kontrolnímu roztoku.

Absorbance zkoušeného roztoku není vyšší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně a za stejných podmínek za použití 0,5 ml roztoku připraveného zředěním *formaldehydu R* obsahujícího 5 μg formaldehydu (CH_2O) v 1 ml.

Jestliže zkoušená vakcína je ve formě emulze, je nutno oddělit vodnou fázi následujícím způsobem:

K vakcíně se přidá stejný objemový díl *isopropylmyristatu R* a promíchá se. Ke 3 objemovým dílům této směsi se přidají 2 objemové díly *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*, 3 objemové díly *chloroformu R* a 4 objemové díly roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Směs se důkladně promíchá a odstřeďuje se 60 min při 15 000 g_n. Oddělí se vodná vrstva a změří se její objem. Tato vrstva se použije k výše popsané zkoušce na formaldehyd.

Koncentrace formaldehydu v porovnávacím roztoku se upraví podle zředění vakcíny při oddělení vodné vrstvy. Jestliže se popsaným postupem vodná vrstva neoddělí, je nutné k roztoku chloridu sodného přidat roztok *polysorbátu 20 R* (100 g/l) a postup opakovat s tím rozdílem, že se odstřeďuje při 22 500 g_n.

2.4.19 Zásaditě reagující látky v mastných olejích

Ve zkumavce se smíchá 10 ml čerstvě předestilovaného *acetonu R* a 0,3 ml *vody R* a přidá se 0,05 ml roztoku *modři bromfenolové R* (0,4 g/l) v *lihu 96% R*. Je-li to potřebné, roztok se neutralizuje *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* nebo *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS*.

Potom se přidá 10 ml zkoušeného oleje, protřepe se a nechá se stát. Na změnu zbarvení horní vrstvy do žluta se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

2.4.20 Antioxidanty v mastných olejích

Zkouší se tenkovrstvou chromatografií (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*. Před použitím se desky s vrstvami suší 2 h při 130 °C.

Zkoušený roztok (a). K 20 g zkoušené látky odebrané ze středu vzorku nebo k 20 g oleje se přidá 50 ml *etheru petrolejového R* a vytřepává se dvakrát 30 ml roztoku *methanolu R* 75% (*V/V*).

Spodní methanolová vrstva se oddělí a spojené methanolové vrstvy se odpaří za sníženého tlaku, při co nejnižší teplotě a dle možnosti v atmosféře dusíku. Zbytek po odpaření se rozpustí v 5 ml *chloroformu prostého ethanolu R*. Uchovává se v dobře uzavřeném obalu.
Zkoušený roztok (b). Petroletherová vrstva získaná při přípravě zkoušeného roztoku (a) se opatrně odpaří do sucha. Přidá se 0,5 g *pyrogallolu R* rozpuštěného ve 100 ml *ethanolu R,* 15 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (330 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po vychladnutí se přidá 250 ml *vody R* a nezmýdelnitelné látky se vytřepávají třikrát 100 ml *etheru petrolejového R*. Spojené petroletherové výtřepky se promývají *vodou R* do odstranění alkálií a odpaří se do sucha. Zbytek po odpaření se rozpustí v 5 ml *chloroformu prostého ethanolu R*. Uchovává se v dobře uzavřeném obalu.

A. Nepolyhydroxylované antioxidanty

Deska s vrstvou se vloží do chromatografické komory a vyvíjí se *chloroformem prostým ethanolu R* po dráze 12 cm a potom se suší 20 min na vzduchu a 20 min v exsikátoru ve vakuu. Na takto připravenou vrstvu se nanese:

Bod 1, viz obr. 2.4.20-1, zkoušený roztok (a) se nanese do skvrny o průměru nejvýše 5 mm. Nanášené množství je závislé na koncentraci zkoušeného roztoku, obvykle 2 μl až 10 μl.

Body 2 a 3, viz obr. 2.4.20-1, 2 μl barevného roztoku obsahujícího po 0,1 g/l *žluti dimethylové R*, *červeně sudanové G R* a *modři indofenolové R* v *benzenu R*.

Vyznačí se dráha 10 cm v obou směrech vyvíjení a vyvíjí se nejdříve *chloroformem prostým ethanolu R*. Po 10 min vysušení na vzduchu se deska s vrstvou otočí o 90° a vyvíjí se v druhém směru *benzenem R*. Po 5 min vysušení na vzduchu se vrstva postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *ethanolu R* do vzniku trvale žluté barvy. Během 2 min se začnou objevovat modré skvrny. Potom se vrstva vystaví na 5 min až 10 min parám amoniaku do odbarvení pozadí na čistě bílé. Vzniklé skvrny mají modrou, slabě fialovou nebo nazelenalou barvu.

Chromatogram se hodnotí podle obr. 2.4.20-1. Objeví-li se modré skvrny na startu, provede se rozdělení a identifikace polyhydroxyantioxidantů (viz B).

B. Polyhydroxyantioxidanty

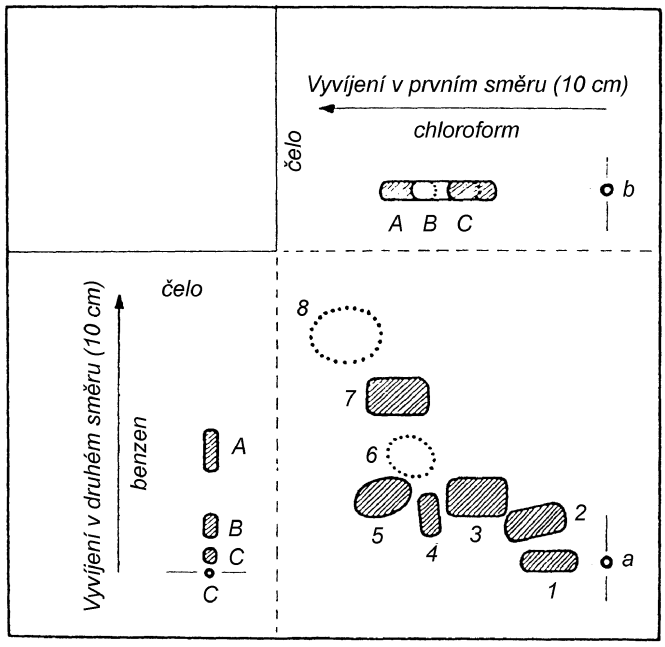
Na vrstvu se odděleně nanese 1 μl, 2 μl, 4 μl a 6 μl zkoušeného roztoku (a) a 1 μl až 2 μl barevného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, etheru petrolejového R* a *benzenu R* (30 + 60 + 60) po dráze 13 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R (200 g/l)* v *ethanolu R* a pokračuje se stejně, jak je popsáno v odstavci A. Polyhydroxyantioxidanty se identifikují polohou skvrn v porovnání se skvrnami barevného roztoku na obr. 2.4.20-2.

C. Antioxidanty neextrahovatelné methanolem

Provede se tenkovrstvá chromatografie na druhé vrstvě za použití zkoušeného roztoku (b). Postupuje se stejně, jak je uvedeno v odstavci A, s tím rozdílem, že se vrstva postříká roztokem *dichlorchinonchlorimidu R* (10 g/l) v *ethanolu R*. Skrvny se objeví během 15 min po postříkání. Chromatogram se hodnotí v porovnání s obr. 2.4.20-1.

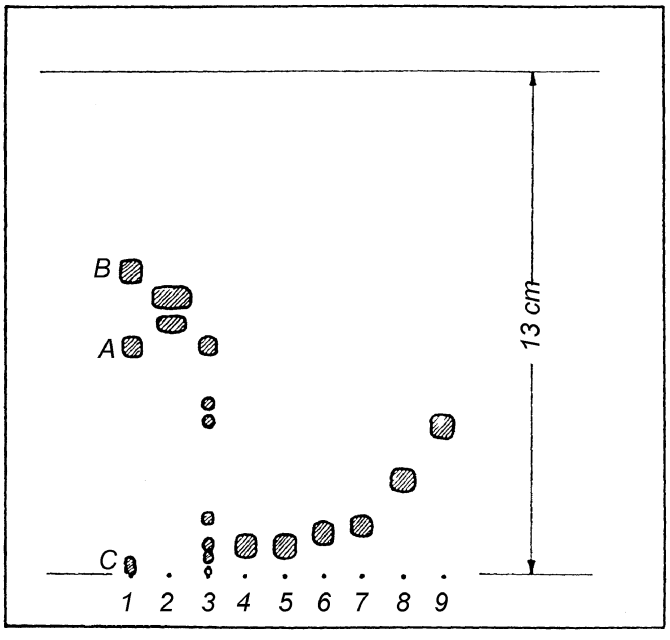
Tečkované skvrny odpovídají α-tokoferolu a butylhydroxytoluenu. Skvrny β- a γ-tokoferolu se objeví v místě odpovídajícím 2-terc.butyl-4-methoxyfenolu.

Jestliže je butylhydroxytoluen přítomný ve velkém množství, může být detegovaný i způsobem A.



Obr. 2.4.20-1 Typické chromatogramy antioxidantů (Metoda A a Metoda C).

a - bod startu č. 1 + skvrna gallatů + skvrna kyseliny nordihydroquajaretové
b - bod startu č. 2
c - bod startu č. 3
1 - guajaková pryskyřice
2 - 3-terc.butyl-4-methoxyfenol
3 - 2-terc.butyl-4-methoxyfenol
4 - 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol
5 - tetraethylthiuramdisulfid
6 - α-tokoferol
7 - dibutylhydroxyanisol
8 - hydroxytoluen
A - žlutá
B - červená
C - modrá
Metoda A - plná čára
Metoda C - tečkovaná čára



Obr. 2.4.20-2 Typické chromatogramy polyhydroxyantioxidantů (Metoda B)

1 - barevný roztok
2 - butylhydroxyanisol
3 - guajaková pryskyřice
4 - kyselina nordihydroguajaretová
5 - methylgallat
6 - ethylgallat
7 - propylgallat
8 - oktylgallat
9 - dodecylgallat
A - žlutá
B - červená
C - modrá

2.4.21 Cizí oleje v mastných olejích tenkovrstvou chromatografií

Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *křemeliny G R*. Vrstva se impregnuje v chromatografické komoře vhodným množstvím směsi objemových dílů *parafinu tekutého R* a *etheru petrolejového R* (10 + 90) vyvíjením po dráze 12 cm od spodního okraje desky, přičemž hladina směsi sahá 5 mm nad spodní okraj desky. Potom se deska s vrstvou nechá volně na vzduchu do vytěkání rozpouštědel, asi 5 min. Chromatogram je třeba vyvíjet ve stejném směru jako impregnace.

Příprava směsi mastných kyselin. 2 g zkoušeného oleje se zahřívají 45 min s 30 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l v lihu R* pod zpětným chladičem. Pak se přidá 50 ml *vody R*, ochlazená směs se převede do dělicí nálevky a vytřepává se třikrát 50 ml *etheru R*. Etherová vrstva se odstraní, vodná

vrstva se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou R* a vytřepává se znovu třikrát 50 ml *etheru R*. Spojené etherové výtřepky se promyjí třikrát 10 ml *vody R*, promývací tekutiny se odstraní, vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Ether se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se použije k přípravě roztoku zkoušené látky. Mastné kyseliny mohou být také získány z roztoku připraveného při stanovení nezmýdelnitelných látek.
Zkoušený roztok. 40 mg směsi mastných kyselin získané výše uvedeným postupem se rozpustí ve 4 ml *chloroformu R*.
Porovnávací roztok. 40 mg směsi mastných kyselin získané ze směsi *kukuřičného oleje R* a *řepkového oleje R* (19 + 1) se rozpustí ve 4 ml *chloroformu R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 3 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *kyseliny octové ledové R* (10 + 90) po dráze 8 cm. Vrstva se suší 10 min při 110 °C. Po ochlazení, není-li předepsáno jinak, se deska s vrstvou vloží do dobře těsnící komory nasycené parami *jodu R* umístěného na dně komory na odpařovací misce. Po nějakém čase jsou na vrstvě patrny hnědé nebo žlutohnědé skvrny. Deska s vrstvou se vyjme z komory a nechá se několik min stát. Když hnědé zbarvení pozadí zmizí, postříká se vrstva *škrobem RS.* Objeví se modré skvrny, které se mohou změnit na hnědé a po postříkání *vodou R* se změní zpět na modré.

Na chromatogramu zkoušené látky jsou patrny skvrny o R_F asi 0,5 (kyselina olejová) a R_F asi 0,65 (kyselina linolová) odpovídající svojí polohou a zabarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. U některých olejů může být na chromatogramu zkoušené látky patrna ještě skvrna s R_F asi 0,75 (kyselina linolenová). Porovnáním skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku se skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku se ověří nepřítomnost skvrny s hodnotou R_F asi 0,25 (kyselina eruková) na chromatogramu zkoušeného roztoku.

2.4.22 Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií

Cizí oleje se stanoví jako methylestery mastných kyselin přítomných ve zkoušených olejích.

Tato metoda není použitelná pro oleje obsahující acylglyceroly mastných kyselin s epoxy-, hydroepoxy-, cyklopropyl- a cyklopropenylovými skupinami nebo pro oleje s velkým podílem mastných kyselin s kratším řetězcem než 8 uhlíkových atomů nebo pro oleje s vyšším číslem kyselosti než 2.

Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) (náplňová kolona nebo kapilární kolona).

Zkoušený roztok. Je-li v článku předepsáno, zkoušená látka se před methylací suší. Naváží se 4,0 g zkoušeného oleje do 100ml zabroušené baňky s kulatým dnem opatřené zpětným chladičem a upravené k zavádění plynu. Přidá se 40 ml *methanolu bezvodého R*, 0,5 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (60 g/l) v *methanolu R* a za míchání se pod zpětným chladičem zahřívá k varu za současného probublávání *dusíkem R* rychlostí asi 100 ml/min. Když je roztok čirý (asi po 10 min), pokračuje se v zahřívání ještě 5 min. Baňka se ochladí pod tekoucí vodou a obsah se převede do dělicí nálevky. Vnitřek baňky se opláchne 20 ml *heptanu R*, který se přidá do dělicí nálevky. Přidá se asi 40 ml *vody R* a opatrně se protřepe. Vytvoří-li se emulze, přidá se po kapkách *heptan R* nebo *voda R*. Po rozdělení vrstev se oddělí vodná vrstva a třepe se s dalšími 20 ml *heptanu R*. Obě organické vrstvy se spojí, promyjí se dvakrát 20 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. V případě potřeby se zmenší objem roztoku odpařením na vodní lázni v proudu *dusíku R*. V případě kapilární plynové chromatografie se zkoušený roztok zředí *heptanem R* tak, aby se získal roztok obsahující 5 g/l až 10 g/l směsi methylesterů mastných kyselin.
Porovnávací roztok (a). Podle tab. 2.4.22-1 se připraví 0,50 g směsi kalibračních látek, rozpustí se v *heptanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *heptanem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony nebo kolony z nerezové oceli délky 2 m až 3 m a vnitřního průměru 2 mm až 4 mm naplněné *křemelinou pro chromatografii R* (125 μm až 200 μm) impregnovanou 5 % až 15 % *makrogolsukcinatu R* nebo *makrogoladipatu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 25 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 180 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 200 °C, pokud je to nutné nebo předepsané, zvyšuje se teplota kolony rychlostí 5 °C/min ze 120 °C na 200 °C.

Tab. 2.4.22-1 Kalibrační látky*

Směs následujících látek	Ekvivalentní délka řetězce**	Složení v %	
		Izotermické podmínky	Lineární teplotní program
methyllaurat R	12,0	5	10
methylmyristat R	14,0	5	15
methylpalmitat R	16,0	10	15
methylstearat R	18,0	20	20
methylarachidat R	20,0	40	20
methyloleat R	18,6	20	20

* Pro GC s kapilární kolonou a s nástřikem s děličem se doporučuje, aby složky s nejdelším řetězcem ze směsi, které jsou analyzovány, byly přidávány ke kalibrační směsi.

** Tato hodnota, která má být počítána pomocí kalibrační křivky, je uvedena jako příklad pro kolonu s *makrogolsukcinatem R*.

Chromatografický postup může být alternativně proveden za použití:
- skleněné nebo křemenné kapilární kolony (je dávána přednost koloně se stěnami pokrytými kapalnou fází) délky 10 m až 25 m a vnitřního průměru 0,2 mm až 0,8 mm, jejíž vnitřní povrch je pokryt např. vrstvou *poly(kyanopropyl)(methylfenylmethyl)siloxanu R* nebo *makrogolu 20 000 R* (tloušťky 0,1 μm až 0,5 μm),
- *helia pro chromatografii R* nebo *vodíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1,3 ml/min (pro kolonu o vnitřním průměru 0,32 mm),
- plamenoionizačního detektoru,
- dělicího poměru 1 : 100 nebo menšího, podle vnitřního průměru použité kolony (1 : 50 pro kolonu o vnitřním průměru 0,32 mm).

Teplota kolony se udržuje na 160 °C až 200 °C podle délky a typu použité kolony (pro kolonu délky 30 m pokrytou *makrogolem 20 000 R,* 200 °C), teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C. Je-li nutno nebo předepsáno, zvyšuje se teplota kolony rychlostí 3 °C/min ze 170 °C na 230 °C (pro kolonu s *makrogolem 20 000 R*).

Nastříkne se 0,5 μl porovnávacího roztoku (a). Upraví se citlivost detektoru tak, aby výška nejvyššího píku na chromatogramu byla 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače.

Určí se retenční časy jednotlivých mastných kyselin. Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku (b) a zkontroluje se poměr signálu k šumu pro pík odpovídající methylmyristatu.

Nastříkne se 0,5 μl až 1,0 μl zkoušeného roztoku a nastaví se vhodná citlivost detektoru. Zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času methyloleatu.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže:
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je počet teoretických pater (*n*) (*2.2.28*), počítáno pro pík odpovídající methylstearatu, nejméně 2000 pro náplňovou kolonu a 30 000 pro kapilární kolonu,
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je rozlišení (R_s) (*2.2.28*) mezi píky odpovídajícími methyloleatu a methylstearatu nejméně 1,25 pro náplňovou a 1,8 pro kapilární kolonu, a je-li předepsáno v článku, rozlišení mezi píky odpovídajícími methyllinolenatu ($C_{18:3}$) a methylarachidatu ($C_{20:0}$) nebo methylarachidatu ($C_{20:0}$) a methyleikosenatu ($C_{20:1}$) nejméně 1,8,
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je poměr signálu k šumu pro pík odpovídající methylmyristatu nejméně 5.

Vyhodnocení chromatogramů

Je třeba se vyvarovat pracovních podmínek, které umožňují vznik maskovaných píků (přítomnost složek s malými rozdíly v retenčních časech, jako u kyseliny linolenové a kyseliny arachidové).

Kvalitativní analýza. Sestrojí se kalibrační křivka za použití chromatogramu získaného s kalibračními látkami (porovnávací roztok (a)) a informací v tabulce 2.4.22-1:

a) za izotermických podmínek vynesením logaritmů redukovaných retenčních časů jako funkce počtu uhlíkových atomů mastné kyseliny, identifikují se píky pomocí takto získané přímky a "ekvivalentních délek řetězce" pro různé píky. Kalibrační křivka nasycených kyselin je přímka. Logaritmy redukovaných retenčních časů nenasycených kyselin jsou umístěny na této přímce v bodech odpovídajících necelým číslům, která se nazývají "ekvivalentní délky řetězce",

b) za podmínek lineárního teplotního programu vynesením retenčních časů jako funkce počtu uhlíkových atomů mastných kyselin; určení totožnosti se provede pomocí kalibrační křivky.

Kvantitativní analýza. Používá se metoda vnitřní normalizace, při níž součet ploch všech píků na chromatogramu, kromě píku rozpouštědla, je brán jako 100 %. Doporučuje se použití elektronického integrátoru. Obsah složky je vypočítán jako procentuální podíl plochy odpovídajícího píku z celkového součtu všech píků. Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05 % celkové plochy.

2.4.23 Steroly v mastných olejích

Separace sterolového podílu

Připraví se nezmýdelnitelný podíl, sterolový podíl mastného oleje se izoluje tenkovrstvou chromatografií *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R* o tloušťce 0,3 mm až 0,5 mm.

Zkoušený roztok (a). Do baňky na 150 ml se zpětným chladičem se převede příslušný objem roztoku *betulinu R* (2 g/l) v *dichlormethanu R* (roztok vnitřního standardu). Obsah betulinu v tomto roztoku odpovídá asi 10 % obsahu sterolů ve zkoušeném vzorku (např. v případě olivového oleje se přidá 500 μl, k ostatním rostlinným olejům se přidá 1500 μl roztoku *betulinu R*). Jestliže je v článku uveden požadavek na obsah jednotlivých sterolů vyjádřený jako procento sterolového podílu, může být přídavek betulinu vynechán.

Roztok se odpaří v proudu *dusíku R* do sucha, přidá se 5,00 g zkoušené látky (*m* g), 50 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS* a zahřívá se 1 h na vodní lázni pod zpětným chladičem za častého protřepávání. Po ochlazení na teplotu nižší než 25 °C se obsah baňky převede do dělicí nálevky pomocí 100 ml *vody R*. Protřepe se opatrně třikrát 100 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Spojené etherové výtřepky se v další dělicí nálevce mírně protřepávají několik min se 40 ml *vody R*. Vodná vrstva se odstraní a etherová vrstva se protřepává několikrát 40 ml *vody R* tak dlouho, dokud vodná vrstva již nereaguje zásaditě na fenolftalein. Etherová vrstva se převede

do předem zvážené baňky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*; dělicí nálevka se promyje *etherem prostým peroxidických látek R* a promývací tekutina se přidá k roztoku v baňce. Ether se opatrně oddestiluje, zbytek se smíchá s 6 ml *acetonu R*, rozpouštědlo se opatrně odpaří v proudu *dusíku R* a suší se při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti. Po ochlazení v exsikátoru se zváží. Zbytek se rozpustí v co nejmenším potřebném množství *dichlormethanu R*.
Zkoušený roztok (b). Použije se 5,00 g *oleje řepkového R*. Postupuje se způsobem uvedeným v odstavci Zkoušený roztok (a) počínaje slovy "přidá se 50 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS*".
Zkoušený roztok (c). Použije se 5,00 g *oleje slunečnicového R*. Postupuje se způsobem uvedeným v odstavci Zkoušený roztok (a) počínaje slovy "přidá se 50 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS*".
Porovnávací roztok. 25 mg *cholesterolu R* a 10 mg *betulinu R* se rozpustí v 1 ml *dichlormethanu R*.

Pro každý zkoušený roztok se použije samostatná vrstva. Na vrstvu se nanese odděleně do pruhu (20 mm x 3 mm) 20 μl porovnávacího roztoku a do pruhu (40 mm x 3 mm) po 0,4 ml zkoušeného roztoku (a), zkoušeného roztoku (b) nebo zkoušeného roztoku (c). Vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (35 + 65) po dráze 18 cm. Vrstvy se usuší v proudu *dusíku R,* postříkají se roztokem *dichlorfluoresceinu R* (2 g/l) v *ethanolu R* a pozorují se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou skvrny ve tvaru pruhů odpovídající cholesterolu a betulinu. Na chromatogramech zkoušených roztoků jsou skvrny ve tvaru pruhů s podobnými hodnotami R_F, které odpovídají sterolům.

Z každého chromatogramu se vypreparuje plocha odpovídající ploše sterolových pruhů a kromě toho i plochy 2 mm až 3 mm nad a pod těmito pruhy odpovídajícími pruhům na chromatogramech porovnávacího roztoku. Do tří baněk na 50 ml se převedou odděleně vypreparované vrstvy a každá baňka se protřepe s 15 ml horkého *dichlormethanu R*. Každý roztok se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (40) nebo vhodným filtračním papírem, každý filtr se promyje třikrát 15 ml *dichlormethanu R*. Filtráty a promývací tekutiny z každé filtrace se v předem zvážených baňkách odpaří v proudu *dusíku R* do sucha. Zbytek po odpaření se zváží.

Stanovení sterolů

Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*). *Zkouška se provádí za ochrany před vlhkostí. Roztoky se připravují těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. Ke sterolům získaným ze zkoušené látky separací tenkovrstvou chromatografií se přidá (na 1 mg zbytku po odpaření) 0,02 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů *chlortrimethylsilanu R*, *hexamethyldisilazanu R* a *pyridinu bezvodého R* (1 + 3 + 9). Opatrně se protřepává do úplného rozpuštění sterolů a nechá se stát 30 min v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R*. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se supernatantní tekutina.
Porovnávací roztok (a) K devíti dílům sterolů získaným z *oleje řepkového R* separací tenkovrstvou chromatografií se přidá jeden díl *cholesterolu R*. Ke směsi se přidá (na 1 mg zbytku po odpaření) 0,02 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů *chlortrimethylsilanu R*, *hexamethyldisilazanu R* a *pyridinu bezvodého R* (1 + 3 + 9). Opatrně se protřepává do úplného rozpuštění sterolů. Nechá se stát 30 min v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R*. Je-li třeba, odstředí se, použije se čirý roztok.
Porovnávací roztok (b). Ke sterolům získaným ze *slunečnicového oleje R* separací tenkovrstvou chromatografií se přidá (na 1 mg zbytku po odpaření) 0,02 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů *chlortrimethylsilanu R*, *hexamethyldisilazanu R* a *pyridinu bezvodého R* (1 + 3 + 9). Opatrně se protřepává do úplného rozpuštění sterolů a nechá se stát 30 min v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R*. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se supernatantní tekutina.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kapilární křemenné kolony délky 20 m až 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřními stěnami pokrytými vrstvou *poly[fenyl(5)methyl(95)]siloxanu R* nebo *poly[fenyl(5)methyl(94)vinyl(1)]siloxanu R* (tlouštka vrstvy 0,25 μm),
- *vodíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 cm/min až 50 cm/min nebo *helia pro chromatografii R* při průtokové rychlosti 20 cm/min až 35 cm/s. Měření průtokové rychlosti se provede takto: za podmínek stanovení sterolů se nastříkne 1 μl až 3 μl methanu nebo propanu. Změří se čas v sekundách potřebný k průtoku plynu kolonou, tzn. od okamžiku nástřiku do okamžiku objevení píku (t_M). Průtoková rychlost je poměr l/t_M, v němž l značí délku kolony v centimetrech,
- plamenoionizačního detektoru,
- injektoru s děličem (1/50 nebo 1/100).

Teplota kolony se udržuje na 260 °C, teplota nástřikového prostoru na 280 °C, teplota detektoru na 290 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztok. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou čtyři hlavní píky odpovídající cholesterolu, brassikasterolu, kampesterolu a β-sitosterolu. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři hlavní píky odpovídající kampesterolu, stigmasterolu, β-sitosterolu a Δ7-stigmastenolu. Retenční časy sterolů vztažené k retenčnímu času β-sitosterolu jsou uvedeny v tabulce 2.4.23-1.

Pík roztoku vnitřního standardu (betulin) musí být zřetelně oddělen od píků stanovovaných sterolů.

Tab. 2.4.23-1 Retenční časy sterolů vztažené k β-sitosterolu na dvou různých kolonách

	Poly[fenyl(5) methyl(95)]siloxan	Poly[fenyl(5) methyl(94)vinyl(1)]siloxan
cholesterol	0,63	0,67
brassikasterol	0,71	0,73
24-methylen-cholesterol	0,80	0,82
kampesterol	0,81	0,83
kampestanol	0,82	0,85
stigmasterol	0,87	0,88
Δ7-kampesterol	0,92	0,93
Δ5,23-stigmastadienol	0,95	0,95
klerosterol	0,96	0,96
ß-sitosterol	1,00	1,00
sitostanol	1,02	1,02
Δ5-avenasterol	1,03	1,03
Δ5,24-stigmastadienol	1,08	1,08
Δ7-stigmastenol	1,12	1,12
Δ7-avenasterol	1,16	1,16
betulin	1,4	1,6

Na chromatogramu zkoušeného roztoku se určí totožnost jednotlivých píků a obsah jednotlivých sterolů ve sterolovém podílu zkoušené látky v procentech se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A}{S} \cdot 100 ,$$

v němž značí:
A - plochu píku odpovídajícího stanovované složce,
S - součet ploch píků odpovídajících látkám uvedeným v tabulce 2.4.23-1.

Je-li to předepsáno v článku, vypočítá se obsah jednotlivých sterolů v miligramech na 100 g zkoušené látky podle vztahu:

$$\frac{A \,.\, m_S \,.\, 100}{A_S \,.\, m},$$

v němž značí:
A - plochu píku stanovované složky,
A_S - plochu píku betulinu,
m - navážku zkoušené látky v gramech,
m_S - navážku přidaného betulinu v miligramech.

2.4.24 Zbytková rozpouštědla

Zkouška je určena pro stanovení zbytkových rozpouštědel v látkách rozpustných ve vodě. Pro látky nerozpustné nebo nedostatečně rozpustné ve vodě je rozpouštědlo použité pro přípravu roztoku vzorku a pro statické head-space podmínky uvedené v jednotlivých článcích.

Zkouší se plynovou chromatografií se statickým head-space nástřikem (*2.2.28*).

Roztok vzorku. Pokud není předepsáno jinak, rozpustí se 0,200 g zkoušené látky ve *vodě R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Roztok rozpouštědel (a). Rozpustí se po 0,50 g *acetonitrilu R* a *chloroformu R* a po 1,00 g *benzenu R*, *dioxanu R*, *dichlormethanu R*, *pyridinu R* a *trichlorethylenu R* v *dimethylsulfoxidu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Roztok rozpouštědel (b). Připraví se jako roztok rozpouštědel (a), ale použije se pouze rozpouštědlo nebo rozpouštědla přítomná ve zkoušené látce a zředí se tak, aby výsledná koncentrace byla 1/20 limitního množství uvedeného v článku.

Slepá zkouška. Připraví se jako roztok (b), ale bez přídavku rozpouštědla nebo rozpouštědel (používá se k ověření nepřítomnosti interferujících píků) (kontrolní roztok).

Zkoušený roztok. 5,0 ml roztoku vzorku se smíchá s 1,0 ml kontrolního roztoku v lahvičce, z níž bude nastřikováno.

Porovnávací roztok. 5,0 ml roztoku vzorku se smíchá s 1,0 ml roztoku rozpouštědel (b) v lahvičce, z níž bude nastřikováno.

Lahvičky se uzavřou pomocí pryžové zátky pokryté polytetrafluorethylenovou fólií a zajistí se hliníkovým uzávěrem. Obsah lahvičky se protřepe, aby vznikl homogenní roztok.

Mohou být použity tyto podmínky statického head-space nástřiku:
- teplota ustavování rovnováhy: 80 °C,
- doba ustavování rovnováhy: 60 min,
- teplota spojovacího vedení: 85 °C,
- nosný plyn: *dusík pro chromatografii R* nebo *helium pro chromatografii R* o vhodném tlaku,
- doba tlakování: 30 s,
- nastřikovaný objem: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití systému A.

Systém A

Použije se:
- křemenná kapilární kolona délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm nebo 0,53 mm s vnitřními stěnami pokrytými síťovanými 6 % polykyanopropylfenylsiloxanu a 94 % polydimethylsiloxanu (tlouštka vrstvy 1,8 μm nebo 3 μm),
- *helium pro chromatografii R* jako nosný plyn s dělicím poměrem 1/5, při lineární rychlosti asi 35 cm/s,
- plamenoionizační detektor (nebo, je-li zapotřebí pro chlorovaná rozpouštědla, detektor elektronového záchytu).

Teplota kolony se udržuje na 40 °C po dobu 20 min, pak následuje nárůst teploty rychlostí 10 °C/min do 240 °C a izotermický ohřev 20 min při této teplotě, teplota nástřiku se udržuje na 140 °C a teplota detektoru na 250 °C.

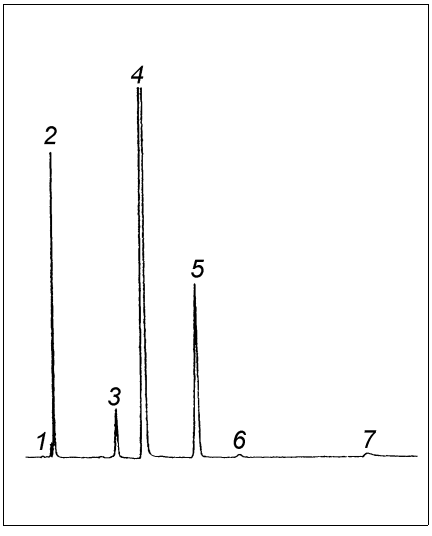
V případě, že dochází k interferenci s matricí, se použije systém B.

Systém B

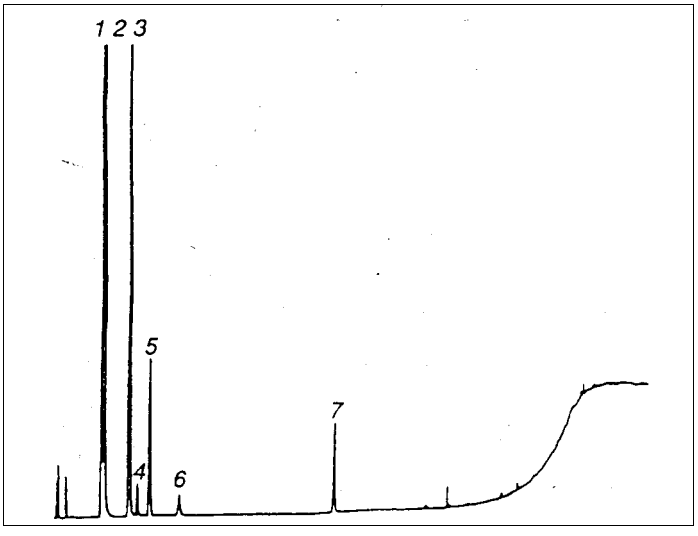
Použije se:
- křemenná kapilární kolona délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm nebo 0,53 mm s vnitřními stěnami pokrytými *makrogolem 20 000 R* (tlouštka vrstvy je 0,25 μm),
- *helium pro chromatografii R* jako nosný plyn s dělicím poměrem 1/5, při lineární rychlosti 35 cm/s,
- plamenoionizační detektor (nebo, je-li zapotřebí pro chlorovaná rozpouštědla, detektor elektronového záchytu).

Teplota kolony se udržuje na 50 °C po dobu 20 min, pak následuje nárůst teploty rychlostí 6 °C/min do 165 °C a izotermický ohřev 20 min při této teplotě, teplota nástřiku se udržuje na 140 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze roztoku rozpouštědel (a) na kolonu popsanou v systému A nebo B a zaznamená se chromatogram za takových podmínek, aby bylo možno měřit poměr signálu k šumu pro chloroform. Tento poměr musí být nejméně 3. Zkoušku lze hodnotit, jestliže:
- při použití systému A, viz obr. 2.4.24-1, rozpouštědla eluují v pořadí: acetonitril, dichlormethan, chloroform, benzen, trichlorethylen, dioxan, pyridin a dimethylsulfoxid; rozlišení mezi píkem acetonitrilu a píkem dichlormethanu je nejméně 1,0,
- při použití systému B, viz obr. 2.2.24-2, rozpouštědla eluují v pořadí: dichlormethan, benzen, trichlorethylen, acetonitril, chloroform, dioxan, pyridin a dimethylsulfoxid; rozlišení mezi píkem acetonitrilu a píkem trichlorethylenu je nejméně 1,0.



Obr. 2.4.24-1 Chromatogram roztoku rozpouštědel (a) za použití systému A



Obr. 2.4.24-2 Chromatogram roztoku rozpouštědel (a) za použití systému B

1. acetonitril
2. dichlormethan
3. chloroform
4. benzen
5. trichlorethylen
6. dioxan
7. pyridin

1. dichlormethan
2. benzen
3. trichlorethylen
4. acetonitril
5. chloroform
6. dioxan
7. pyridin

Nastříkne se 1 ml plynné fáze ze zkoušeného roztoku a 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku na kolonu, popsanou v systému A, nebo je-li nutno, v systému B. Nástřik se opakuje ještě dvakrát. Střední hodnota plochy píku zbytkového rozpouštědla (popř. ploch píků zbytkových rozpouštědel) na chromatogramech získaných se zkoušeným roztokem není větší než polovina střední hodnoty píků odpovídajících zbytkovým rozpouštědlům na chromatogramech získaných s porovnávacím roztokem.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch ze tří nástřiků porovnávacího roztoku (korigovaných navážkou) není větší než 15 %.

Jsou-li zbytková rozpouštědla přítomna v koncentraci 0,1 % a větší, může být obsah stanovován kvantitativně metodou standardního přídavku.

2.4.25 Zbytkový ethylenoxid a dioxan

Zkouška je určena pro stanovení zbytkového ethylenoxidu v látkách rozpustných ve vodě nebo dimethylacetamidu. Pro látky nerozpustné nebo nedostatečně rozpustné ve vodě je rozpouštědlo použité pro přípravu zkoušeného roztoku a pro statické head-space podmínky uvedené v jednotlivých článcích.

Zkouší se head-space plynovou chromatografií (*2.2.28*).

A. Pro látky rozpustné nebo mísitelné s vodou se použije následující postup:

Zkoušený roztok. Do 10ml lahvičky (za jiných podmínek může být použita i jiná velikost) se naváží 1,00 g (M_T) zkoušené látky a přidá se 1,0 ml *vody R*. Lahvička se uzavře, obsah se protřepe, aby vznikl homogenní roztok a nechá se stát 45 min při 70 °C.

Porovnávací roztok (a). Do 10ml lahvičky stejného druhu jako u zkoušeného roztoku se naváží 1,00 g (M_R) zkoušené látky, přidá se 0,50 ml *ethylenoxidu RS3* a 0,50 ml *dioxanu RS1*. Lahvička se uzavře, obsah se protřepe, aby vznikl homogenní roztok, a nechá se stát 45 min při 70 °C.

Porovnávací roztok (b). K 0,50 ml *ethylenoxidu RS3* v 10ml lahvičce se přidá 0,10 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l) a 0,10 ml *dioxanu RS1*. Lahvička se uzavře, obsah se protřepe, aby vznikl homogenní roztok, a nechá se stát 45 min při 70 °C.

B. Pro látky rozpustné nebo mísitelné s dimethylacetamidem lze použít následující postup:

Zkoušený roztok. Do 10ml lahvičky (za jiných podmínek může být použita i jiná velikost) se naváží 1,00 g (M_T) zkoušené látky a přidá se 1,0 ml *dimethylacetamidu R* a 0,20 ml *vody R*. Lahvička se uzavře, obsah se protřepe, aby vznikl homogenní roztok, a nechá se stát 45 min při 90 °C.

Porovnávací roztok (a). Do 10ml lahvičky stejného druhu jako u zkoušeného roztoku se naváží 1,00 g (M_R) zkoušené látky, přidá se 1,0 ml *dimethylacetamidu R* a 0,10 ml *dioxanu RS* a 0,10 ml *ethylenoxidu RS2*. Lahvička se uzavře, obsah se protřepe, aby vznikl homogenní roztok, a nechá se stát 45 min při 90 °C.

Porovnávací roztok (b). K 0,10 ml *ethylenoxidu RS2* v 10ml lahvičce se přidá 0,10 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l) a 0,10 ml *dioxanu RS1*. Lahvička se uzavře, obsah se protřepe, aby vznikl homogenní roztok.

Mohou se použít následující podmínky statického head-space nástřiku:
- teplota ustavování rovnováhy: 70 °C (90 °C pro roztoky v dimethylacetamidu),
- doba ustavování rovnováhy: 45 min,
- teplota spojovacího vedení: 75 °C (150 °C pro roztoky v dimethylacetamidu),
- nosný plyn: *helium pro chromatografii R*,
- doba tlakování: 1 min,
- doba nástřiku: 12 s.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné nebo křemenné kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřními stěnami pokrytými *polydimethylsiloxanem R* (tloušťka vrstvy 1,0 µm),
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při lineární rychlosti asi 20 cm/s a s dělicím poměrem 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C po dobu 5 min, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min do 180 °C, rychlostí 30 °C/min do 230 °C a pak následuje izotermický ohřev 5 min při této teplotě. Teplota nástřiku se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se vhodný objem, např. 1,0 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška píků na chromatogramu ethylenoxidu a acetaldehydu byla nejméně 15 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími acetaldehydu a ethylenoxidu je nejméně 2,0 a poměr signálu k šumu pro ethylenoxid je nejméně 5.

Nastříkne se odděleně vhodný objem, např. 1,0 ml (nebo stejný objem užitý pro porovnávací roztok (b)) plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Celý postup se opaku-

je dvakrát. Průměrná hodnota plochy píků ethylenoxidu a dioxanu na chromatogramu zkoušeného roztoku není větší než polovina průměrné hodnoty plochy odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 μg/g ethylenoxidu a 50 μg/g dioxanu).

Ověření přesnosti

Pro každou dvojici nástřiků se pro ethylenoxid a dioxan vypočte rozdíl ploch mezi píky získanými se zkoušeným roztokem a s porovnávacím roztokem (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ze tří nástřiků pro ethylenoxid je menší než 15 % a relativní směrodatná odchylka ze tří nástřiků pro dioxan je menší než 10 %. Jestliže porovnání mezi zkoušeným roztokem a porovnávacím roztokem se liší u 1,0 g více než o 0,5 %, je nutno udělat vhodnou korekci.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočte ze vzorce:

$$\frac{A_T \cdot C}{(A_R \cdot M_T) - (A_T \cdot M_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
M_T - navážku zkoušené látky ve zkoušeném roztoku v g,
M_R - navážku zkoušené látky v porovnávacím roztoku v g,
C - množství ethylenoxidu přidaného k porovnávacímu roztoku (a) v µg.

Obsah dioxanu v μg/g se vypočte podle vzorce:

$$\frac{D_T \cdot C}{(D_R \cdot M_T) - (D_T \cdot M_R)},$$

v němž značí:

D_T - plochu píku dioxanu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
D_R - plochu píku dioxanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
C - množství dioxanu přidaného k porovnávacímu roztoku (a) v µg.

2.5 Stanovení obsahu

2.5.1 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti I_A udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné k neutralizaci volných kyselin obsažených v 1 g látky.

10,00 g zkoušené látky nebo její předepsané množství (m) se rozpustí v 50 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *etheru R* předem zneutralizované *hydroxidem draselným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS1* jako indikátoru, pokud není uvedeno jinak. Po rozpuštění látky se titruje *hydroxidem draselným 0,1 mol/l VS* do vzniku slabě červeného zbarvení stálého po dobu nejméně 15 s (n).

Číslo kyselosti (I_A) se vypočítá podle vzorce:

$$I_A = \frac{5{,}610n}{m} ,$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v g,
n - spotřebu *hydroxidu draselného 0,1 mol/l VS* v ml.

2.5.2 Číslo esterové

Esterové číslo I_E udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné ke zmýdelnění esterů obsažených v 1 g látky. Vypočítá se z rozdílu čísla zmýdelnění I_S a čísla kyselosti I_A.

$$I_E = I_S - I_A$$

2.5.3 Číslo hydroxylové

Hydroxylové číslo I_{OH} udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné k neutralizaci kyseliny vázané při acetylaci 1 g látky.

Metoda A

Pokud není v článku uvedeno jinak, převede se předepsané množství zkoušené látky uvedené v tabulce 2.5.3-1 do 150ml acetylační baňky, přidá se předepsané množství *acetanhydridu RS1* (acetylační směsi) uvedené v tabulce 2.5.3-1 a baňka se spojí se vzdušným chladičem.

Tab. 2.5.3-1

Předpokládané číslo I_{OH}	Množství zkoušené látky v g	Množství roztoku *acetanhydridu RS1* v ml
10 - 100	2,000	5,0
100 - 150	1,500	5,0
150 - 200	1,000	5,0
200 - 250	0,750	5,0
250 - 300	0,600 nebo 1,200	5,0 nebo 10,0
300 - 350	1,000	10,0
350 - 700	0,750	15,0
700 - 950	0,500	15,0

Baňka se zahřívá 1 h na vodní lázni tak, aby hladina vodní lázně převyšovala asi 2,5 cm úroveň hladiny tekutiny v baňce. Potom se baňka ochladí a přes chladič se přidá 5 ml *vody R*. Vznikne-li zákal, odstraní se právě potřebným množstvím *pyridinu R* a zaznamená se jeho objem. Obsah baňky se důkladně promíchá a pod zpětným chladičem se zahřívá na vodní lázni ještě 10 min. Baňka se ochladí, chladič a stěny baňky se propláchnou 5 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného na *fenolftalein RS1*. Titruje se *hydroxidem draselným v lihu 0,5 mol/l VS* (n_1) za použití 0,2 ml *fenolftaleinu RS1*. Za stejných podmínek se provede slepá zkouška (n_2).

Hydroxylové číslo I_{OH} se vypočítá podle vzorce:

$$I_{OH} = \frac{28{,}05(n_2 - n_1)}{m} + I_A ,$$

v němž značí:

n_1 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* při titraci v ml,
n_2 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* při slepé zkoušce v ml,
m - navážku zkoušené látky v g,
I_A - číslo kyselosti zkoušené látky.

Metoda B

Odváží se předepsané množství zkoušené látky (m), kvantitativně se převede do suché kuželové baňky na 5 ml se skleněnou zabroušenou zátkou (nebo zátkou z plastické hmoty) a přidají se 2,0 ml *zkoumadla propionanhydridového R*, baňka se uzavře a obsah se opatrně protřepává do rozpuštění látky. Není-li předepsáno jinak, nechá se stát 2 h při pokojové teplotě. Potom se odstraní zátka a baňka i s jejím obsahem se přenese do širokohrdlé kuželové baňky na 500 ml obsahující 25,0 ml roztoku *anilinu R* (9 g/l) v *cyklohexanu R* a 30 ml *kyseliny octové ledové R*. Obsah baňky se promíchá vířivým pohybem a nechá se stát 5 min. Potom se přidá 0,05 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* (n_1) do výsledného smaragdově zeleného zbarvení. Současně se za stejných podmínek provede slepá zkouška (n_2).

Hydroxylové číslo I_{OH} se vypočítá podle vzorce:

$$I_{OH} = \frac{5{,}610\,(n_1 - n_2)}{m} ,$$

v němž značí:

n_1 - spotřebu *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* při titraci v ml,
n_2 - spotřebu *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* při slepé zkoušce v ml,
m - navážku zkoušené látky v g.

Pokud je přítomna voda, provede se korekce zjištěné hodnoty I_{OH} na její obsah (y %) stanovený semimikrostanovením (*2.5.12*) následovně:

$$I_{OH} \text{ korigované} = (I_{OH} \text{ stanovené}) - 31{,}1y$$

2.5.4 Číslo jodové

Číslo jodové I_I udává množství halogenu (přepočtené na jod) v g, které se váže na 100 g látky.

Pokud není uvedeno jinak, naváží se množství zkoušené látky uvedené v tabulce 2.5.4-1 stanovené podle předpokládaného I_I.

Tab. 2.5.4-1

Předpokládané číslo I_I	Množství látky v g
méně než 20	1,000
20 - 60	0,500 - 0,250
60 - 100	0,250 - 0,150
více než 100	0,150 - 0,100

Předepsané množství zkoušené látky (m) se převede do 250ml baňky opláchnuté *kyselinou octovou ledovou R* a opatřené vhodnou zabroušenou zátkou. Není-li uvedeno jinak, rozpustí se v 15 ml *chloroformu R* a opatrně se přidá 25,0 ml *bromidu jodného R*. Baňka se uzavře a za občasného promíchávání se ponechá 30 min ve tmě, pokud není uvedeno jinak. Přidá se 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a 100 ml *vody R* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za intenzivního míchání do změny žlutého zbarvení na téměř bezbarvé. Potom se přidá 5 ml *škrobu RS* a pokračuje se v titraci přidáváním *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* (n_1) po kapkách a za stálého míchání do odbarvení. Za stejných podmínek se provede slepá zkouška (n_2).

Výpočet čísla jodového se provede podle vzorce:

$$I_I = \frac{1{,}269\,(n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:

n_1 - spotřebu *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* při titraci v ml,
n_2 - spotřebu *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* při slepé zkoušce v ml,
m - navážku zkoušené látky v g.

2.5.5 Číslo peroxidové

Číslo peroxidové I_P udává množství aktivního kyslíku v milimolech obsažené v peroxidické formě v 1000 g látky.

5,00 g zkoušené látky (m) se převede do 250ml kuželové baňky se zabroušenou skleněnou zátkou. Přidá se 30 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *chloroformu R* (3 + 2) a třepe se do rozpuštění látky. Potom se přidá 0,5 ml nasyceného roztoku *jodidu draselného R*, promíchá se a přesně za 1 min se přidá 30 ml *vody R*. Titruje se *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS*, který se pomalu přidává za rovnoměrného míchání do změny žlutého zbarvení na téměř bezbarvé. Potom se přidá 5 ml *škrobu RS* a pokračuje se v titraci přidáváním *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* (n_1) po kapkách a za stálého míchání do odbarvení. Současně se za stejných podmínek provede slepá zkouška, při níž není spotřeba *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* vyšší než 0,10 ml.

Číslo peroxidové se vypočítá podle vzorce:

$$I_P = \frac{10(n_1 - n_2)}{m},$$

v němž značí:

n_1 - spotřebu *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* při titraci v ml,
n_2 - spotřebu *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* při slepé zkoušce v ml,
m - navážku zkoušené látky v g.

2.5.6 Číslo zmýdelnění

Číslo zmýdelnění I_S udává množství hydroxidu draselného v miligramech potřebné k neutralizaci volných kyselin a ke zmýdelnění esterů obsažených v 1 g látky.

Předepsané množství zkoušené látky (*m*) se převede do 250ml baňky z borokřemičitého skla a přidá se 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a několik skleněných kuliček. Připojí se zpětný chladič a vaří se 30 min, pokud není předepsáno jinak. Potom se přidá 1 ml *fenolftaleinu RS1* a ihned se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS*. Současně se za stejných podmínek provede slepá zkouška.

Číslo zmýdelnění se vypočte podle vzorce:

$$I_S = \frac{28{,}05(n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:

n_1 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* při titraci v ml,

n_2 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* při slepé zkoušce v ml,

m - navážku zkoušené látky v g.

1998

2.5.7 Nezmýdelnitelné látky

Pod pojmem "nezmýdelnitelné látky" se rozumí látky netěkající při 100 °C až 105 °C získané ze zkoušené zmýdelněné látky extrakcí organickým rozpouštědlem. Výsledek zkoušky se vyjadřuje v procentech (*m/m*).

Předepsané množství zkoušené látky (*m*) se přenese do 250ml baňky, přidá se 50 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS* a zahřívá se pod zpětným chladičem na vodní lázni za častého míchání po dobu 1 h. Po ochlazení na teplotu pod 25 °C se obsah baňky převede do dělicí nálevky obsahující 100 ml *vody R* a opatrně se vytřepává třikrát 100 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Etherové výtřepky se spojí v další dělicí nálevce, několik min se protřepávají se 40 ml *vody R* a vodná vrstva odstraní. Promytí etherové vrstvy se opakuje ještě dvakrát se 40 ml *vody R*. Potom se etherová vrstva postupně promyje 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) a 40 ml *vody R*. Tento postup se opakuje třikrát a etherová vrstva se nakonec několikrát promyje 40 ml *vody R*, dokud vodná vrstva nereaguje zásaditě na fenolftalein.

Etherová vrstva se převede do předem zvážené baňky a dělicí nálevka se promyje *etherem prostým peroxidických látek R*, který se přidá do baňky. Ether se opatrně oddestiluje a ke zbytku se přidá 6 ml *acetonu R*. Rozpouštědlo se odstraní proudem vzduchu a zbytek se vysuší při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží (*a*) a množství nezmýdelnitelných látek vyjádřené v procentech (*m/m*) se vypočítá podle vzorce:

$$\textit{nezmýdelnitelné látky} = \frac{100 \cdot a}{m},$$

v němž značí:

a - hmotnost zůstatku po vysušení v g,

m - navážku zkoušené látky v g.

Zbytek se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného na *fenolftalein R* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS*. Je-li spotřeba *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* vyšší než 0,2 ml, rozdělení vrstev nebylo úplné a zbytek nelze považovat za nezmýdelnitelné látky a zkouška se opakuje.

2.5.8 Dusík v primárních aromatických aminech

Předepsané množství zkoušené látky se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* nebo v jiném předepsaném rozpouštědle a přidají se 3 g *bromidu draselného R*. Ochladí se v ledové vodě a pomalu se titruje *dusitanem sodným 0,1 mol/l VS* za stálého míchání.

Indikace bodu ekvivalence se provádí elektrometricky nebo za použití předepsaného indikátoru.

2.5.9 Dusík mineralizací s kyselinou sírovou

Semimikrometoda

Množství zkoušené látky odpovídající asi 2 mg dusíku se kvantitativně přenese do spalovací baňky, přidají se 4 g upráškované směsi vzniklé smícháním 100 g *síranu draselného R*, 5 g *síranu měďnatého R* a 2,5 g *selenu R*. Přidají se tři skleněné kuličky, všechny částečky se z hrdla baňky spláchnou 5 ml *kyseliny sírové R* a obsah baňky se promíchá. Hrdlo baňky se volně uzavře např. skleněnou nálevkou s krátkým stonkem, aby se zabránilo ztrátám kyseliny sírové. Baňka se postupně zahřívá, dokud nedojde k varu a následné kondenzaci kyseliny sírové v hrdle baňky. Je nutno zabránit přehřátí horní části baňky. Baňka se zahřívá 30 min, pokud není stanoveno jinak. Poté se baňka ochladí, částice se rozpustí opatrným přidáním 25 ml *vody R*, znovu se ochladí a baňka se umístí do přístroje k destilaci s vodní parou. Přidá se 30 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a destiluje se přeháněním vodní parou. Přibližně 40 ml destilátu se jímá do baňky obsahující 20,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS,* k níž bylo přidáno tolik *vody R*, aby ústí chladiče bylo ponořeno pod hladinu. Ke konci destilace se jímací baňka sníží tak, aby konec chladiče byl nad hladinou kyseliny. Je nutno zajistit, aby voda z vnějšího povrchu chladiče nestékala do baňky. Destilát se titruje *hydroxidem sodným 0,01 mol/l VS* za použití *červeně methylové směsného indikátoru RS* (spotřeba n_1 ml).

Za stejných podmínek se provede slepá zkouška za použití 50 mg *glukosy R* místo zkoušené látky (spotřeba n_2 v ml).

Obsah dusíku (x) v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$x = \frac{0{,}01401(n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:

m - navážku zkoušené látky v g,

n_2 - spotřebu *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* při titraci v ml,

n_1 - spotřebu *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* při slepé zkoušce.

2.5.10 Spalování organických látek v kyslíku

Pokud není uvedeno jinak, použije se silnostěnná kuželová baňka na 500 ml z borokřemičitého skla se zabroušenou zátkou, v níž je upevněn vhodný nosič vzorku, např. z platiny nebo platino-iridia.

Předepsané množství jemně rozetřené zkoušené látky se umístí do středu filtračního papíru o rozměru 30 mm x 40 mm opatřeného páskou z filtračního papíru asi 10 mm širokou a 30 mm dlouhou. Pokud je předepsána impregnace papíru uhličitanem lithným, navlhčí se před použitím střed papíru nasyceným roztokem *uhličitanu lithného R* a vysuší se v sušárně. Zkoušená látka se zabalí do papíru a umístí se na nosič vzorku. Do baňky se převede *voda R* nebo předepsaná tekuti-

na pro absorpci spalných produktů a vzduch se vytlačí kyslíkem, např. hadicí zavedenou přímo nad tekutinu. Hrdlo baňky se navlhčí *vodou R*, papírová páska se zapálí a baňka se pevně uzavře zátkou se vzorkem. Po spálení se baňkou silně protřepává, aby spalné produkty přešly do roztoku. Po ochlazení, pokud není uvedeno jinak, se baňka nechá 5 min stát, opatrně se otevře a zátka, stěny baňky a nosič vzorku se opláchnou *vodou R*. Roztoky se spojí a dále se postupuje tak, jak je uvedeno v jednotlivých článcích.

2.5.11 Chelatometrické titrace

Hliník

20,0 ml předepsaného roztoku se přenese do kuželové baňky na 500 ml, přidá se 25,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* a 10 ml směsi stejných objemových dílů roztoku *octanu amonného RS* (155 g/l) a *kyseliny octové zředěné RS* a 2 min se vaří. Po ochlazení se přidá 50 ml *ethanolu R* a 3 ml čerstvě připraveného roztoku *dithizonu R* (0,25 g/l) v *ethanolu R*. Nadbytek *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* se titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l V/S* do změny zelenomodrého zbarvení na červenofialové.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,698 mg Al.

Bismut

Předepsaný roztok v *kyselině dusičné R* se v kuželové baňce na 500 ml zředí *vodou R* na 250 ml. Pokud není uvedeno jinak, přidává se po kapkách a za třepání *amoniak 26% R*, až se začne tvořit zákal. Přidá se 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a roztok se zahřeje asi na 70 °C, až zákal úplně zmizí. Potom se přidá asi 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* a titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS* do změny červenofialového zbarvení na žluté.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,90 mg Bi.

Vápník

Předepsaný roztok se v kuželové baňce na 500 ml zředí *vodou R* na 300 ml. Přidá se 6,0 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a asi 15 mg *kyseliny kalkonkarbonové s chloridem sodným R* a titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS* do změny fialového zbarvení na sytě modré.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,008 mg Ca.

Olovo

Předepsaný roztok se v kuželové baňce na 500 ml zředí *vodou R* na 200 ml. Přidá se 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* a tolik *methenaminu R*, až se roztok zbarví fialovorůžově. Potom se titruje *edetanem disodným 0,1 mol/l VS* do změny fialovorůžového zbarvení na žluté.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,72 mg Pb.

Hořčík

Předepsaný roztok se v kuželové baňce na 500 ml zředí *vodou R* na 300 ml. Přidá se 10,0 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0* a asi 50 mg *černě eriochromové T s chloridem*

sodným R. Zahřeje se na 40 °C a při této teplotě se titruje *edetanem disodným 0,1 mol/l VS* do změny fialového zbarvení na sytě modré.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,431 mg Mg.

Zinek

Předepsaný roztok se v kuželové baňce na 500 ml zředí *vodou R* na 200 ml. Přidá se 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* a tolik *methenaminu R*, až se roztok zbarví fialovorůžově. Po přidání dalších 2 g *methenaminu R* se roztok titruje *edetanem disodným 0,1 mol/l VS* do změny fialovorůžového zbarvení na žluté.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 6,54 mg Zn.

2.5.12 Semimikrostanovení vody

Přístroj se skládá z titrační nádobky o objemu asi 60 ml opatřené dvěma platinovými elektrodami, z trubice pro vstup dusíku, ze zátky, kterou prochází špička byrety, a z odvzdušňovací trubice se sušidlem bránícím vstupu vlhkosti. Zkoušená látka se vnáší do nádobky postranním otvorem, který je uzavíratelný zábrusovou zátkou. Míchání je zajišťováno magnetickým míchadlem nebo proudem vysušeného dusíku zaváděného do roztoku během titrace.

Bod ekvivalence se stanoví ampérometricky. Vhodný obvod se skládá z potenciometru o odporu asi 2000 Ω s paralelně připojenou baterií o napětí 1,5 V jako zdroje měnitelného napětí. Toto napětí se nastaví tak, aby mezi platinovými elektrodami se sériově připojeným mikroampérmetrem procházel nízký počáteční proud. Při přidávání činidla se ručička mikroampérmetru vychyluje, ale ihned se vrací do výchozí polohy. Výchylka získaná v bodu ekvivalence přetrvává nejméně 30 s.

Titruje se *jodosiřičitým činidlem VS* s čerstvě stanoveným titrem (*4.2.2*). Použitá činidla a roztoky musí být uchovávány za nepřístupu vzdušné vlhkosti. *Jodosiřičité činidlo VS* se chrání před světlem a je výhodné ho uchovávat v lahvích opatřených automatickou byretou.

Obchodně dostupná jodosiřičitá činidla se často liší od jodosiřičitého činidla VS náhradou pyridinu různými jinými bazickými látkami. Použití těchto činidel musí být předem validováno tak, aby se pro každý jednotlivý případ ověřila stechiometrie reakce a absence reakce se zkoušenou látkou (1.2 Obecné zásady).

Pokud není uvedeno jinak, použije se Metoda A.

Metoda A

Do titrační nádobky se přidá asi 20 ml *methanolu bezvodého R* nebo rozpouštědla předepsaného v příslušném článku a titruje se *jodosiřičitým činidlem VS* za ampérometrické indikace bodu ekvivalence. Do titrační nádobky se pak rychle převede předepsané množství zkoušené látky, míchá se 1 min a opět se titruje *jodosiřičitým činidlem VS* za ampérometrické indikace bodu ekvivalence.

Metoda B

Do titrační nádobky se přidá asi 10 ml *methanolu bezvodého R* nebo rozpouštědla předepsaného v příslušném článku a titruje se *jodosiřičitým činidlem VS* za ampérometrické indikace bodu ekvivalence. Do titrační nádobky se pak rychle převede předepsané množství zkoušené látky ve vhodném stupni rozmělnění a dále se přidá přesně odměřené množství *jodosiřičitého činidla VS* v nadbytku asi 1 ml nebo v množství předepsaném v příslušném článku. Uzavřená nádobka se ponechá stát chráněna před světlem po dobu 1 min nebo po dobu předepsanou v příslušném článku za občasného

promíchání. Nadbytek *jodosiřičitého činidla VS* se retitruje až do dosažení počáteční nízké proudové intenzity *methanolem bezvodým R* nebo rozpouštědlem uvedeným v příslušném článku, ke kterému bylo přidáno přesné množství *vody R* odpovídající koncentraci asi 2,5 g/l.

2.5.13 Hliník ve vakcínách

Množství zkoušeného zhomogenizovaného přípravku odpovídající 5 mg až 6 mg hliníku se převede do spalovací baňky na 50 ml. Přidá se 1 ml *kyseliny sírové R*, 0,1 ml *kyseliny dusičné R* a několik skleněných kuliček. Směs se zahřívá až do vývoje bílého hustého dýmu. Jestliže směs obsahuje zuhelnatělé zbytky, přidá se několik kapek *kyseliny dusičné R* a pokračuje se v zahřívání k varu až do odbarvení. Ochladí se a po několika minutách se opatrně přidá 10 ml *vody R* a zahřívá se do získání čirého roztoku. Po ochlazení se přidá 0,05 ml *oranže methylové RS* a zneutralizuje se *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* (6,5 ml až 7 ml). Jestliže vznikne sraženina, rozpustí se přidáním několika kapek *kyseliny sírové zředěné RS*. Roztok se převede do kuželové baňky na 250 ml, spalovací baňka se vypláchne 25 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá do kuželové baňky. Přidá se 25,0 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l VS*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,4*, několik skleněných kuliček a 3 min se mírně vaří. Potom se přidá 0,1 ml *pyridylazonaftolu RS* a horký roztok se titruje *síranem měďnatým 0,02 mol/l VS* do změny zbarvení na fialově hnědé. Provede se slepá zkouška.

1 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l VS* odpovídá 0,5396 mg Al.

2.5.14 Vápník ve vakcínách

Všechny roztoky použité v této zkoušce se připraví z vody destilované R.

Provede se stanovení vápníku atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22, Metoda I*).

K 1,0 ml homogenizovaného zkoušeného přípravku se přidá 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 3,0 ml. Měří se absorbance při 620 nm.

2.5.15 Fenol v imunních sérech a vakcínách

Zkoušený přípravek se zhomogenizuje a zředí *vodou R* tak, aby se získal roztok obsahující přibližně 15 µg fenolu v 1 ml. Připraví se porovnávací roztoky obsahující 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg a 30 µg *fenolu R* v 1 ml.

K 5,0 ml zkoušeného roztoku a k 5,0 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 5,0 ml *tlumivého roztoku o pH 9,0*, 5,0 ml *aminopyrazolonu RS* a 5,0 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*. Po 10 min se měří intenzita zbarvení roztoků při 546 nm.

Sestrojí se kalibrační křivka a vypočítá se obsah fenolu ve zkoušeném přípravku.

2.5.16 Bílkoviny v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Bílkoviny se stanoví spektrofotometricky měřením intenzity zbarvení roztoků po reakci s vínanem měďnatým a zkoumadlem molybdenan-wolframovým.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R*. 1 ml tohoto roztoku se

přenese do skleněné zkumavky, přidá se 0,15 ml roztoku *kyseliny trichloroctové R* (400 g/l). Roztok se protřepe, nechá se 15 min stát, 10 min se odstřeďuje při 5000 ot/min a supernatantní tekutina se odstraní. Ke zbytku ve zkumavce se přidá 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS.*

Porovnávací roztoky. 0,100 g *albuminu hovězího R* se rozpustí ve 100,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* (základní roztok obsahující 1 g/l bílkoviny).

1 ml základního roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 20 ml (zředěný roztok (1): 50 mg bílkoviny v litru).

1 ml základního roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 4 ml (zředěný roztok (2): 250 mg bílkoviny v litru).

Do šesti skleněných zkumavek se přenese 0,10 ml, 0,20 ml, 0,40 ml zředěného roztoku (1) a 0,15 ml, 0,20 ml, 0,25 ml zředěného roztoku (2). Obsah každé zkumavky se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 0,4 ml.

Slepá zkouška. Použije se 0,40 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* (kontrolní roztok).

Postup. Do každé zkumavky se přidají 2 ml *vínanu měďnatého RS3*, protřepe se a nechá se 10 min stát. Do každé zkumavky se dále přidá 0,2 ml směsi stejných objemových dílů *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* a *vody R* připravené těsně před použitím. Zkumavky se uzavřou, promíchají se převracením a směs se nechá stát 30 min ve tmě. Modré zbarvení je stálé 60 min. Je-li třeba, odstřeďuje se do získání čirých roztoků.

Měří se absorbance (*2.2.25*) každého roztoku při 760 nm proti kontrolnímu roztoku. Z absorbancí šesti porovnávacích roztoků a z jejich koncentrací bílkovin se sestrojí kalibrační křivka, ze které se odečte obsah bílkoviny ve zkoušeném roztoku.

2.5.17 Nukleové kyseliny v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Spektrofotomerické stanovení nukleových kyselin měřením absorbance při 260 nm.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah jedné lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R.*

Roztok se dle potřeby dále ředí pro získání vhodné hodnoty absorbance pro spektrofotometrické měření. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 260 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Absorbance roztoku nukleové kyseliny (1 g/l) při 260 nm je 20.

2.5.18 Fosfor v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Spektrofotometrické stanovení fosforu měřením intenzity zbarvení roztoku po mineralizaci polysacharidu a reakci s molybdenanem hexaamonným.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R.* Roztok se dále zředí tak, aby 1 ml obsahoval asi 6 μg fosforu. 1,0 ml tohoto roztoku se přenese do 10ml spalovací zkumavky.

Porovnávací roztoky. Rozpuštěním 0,2194 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* v 500 ml *vody R* se připraví roztok obsahující 0,1 mg fosforu v 1 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Do tří spalovacích zkumavek se přenese 0,5 ml, 1,0 ml a 2,0 ml takto ředěného roztoku.

Slepá zkouška. Použijí se 2,0 ml *vody R* ve spalovací zkumavce (kontrolní roztok).

Postup zkoušky. Do všech zkumavek se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se v olejové lázni 1 h při 120 °C a dále při 160 °C tak dlouho, pokud uniká bílý dým (asi 1 h). Potom se přidá 0,1 ml *kyseliny chloristé R* a zahřívá se při 160 °C až do odbarvení roztoku (asi 90 min). Ochladí se, do každé zkumavky se přidají 4 ml *vody R* a 4 ml *zkoumadla molybdenan-hexaamonného R*. Zahřívá se 90 min ve vodní lázni při 37 °C, ochladí se a zředí se *vodou R* na 10,0 ml. Vzniklé modré zbarvení je stálé po několik hodin.

Měří se absorbance (*2.2.25*) každého roztoku při 820 nm proti kontrolnímu roztoku. Z naměřených hodnot absorbance tří porovnávacích roztoků v závislosti na jejich obsahu fosforu se sestrojí kalibrační křivka, ze které se odečte obsah fosforu ve zkoušeném roztoku.

2.5.19 O-acetyl v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Spektrofotometrické stanovení O-acetylových skupin; měří se intenzita zbarvení vzniklého reakcí se železitou solí.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R*. Dále se roztok ředí tak, aby objemy použité ke zkoušce obsahovaly 30 μg až 600 μg acetylcholiniumchloridu (O-acetyl). Ze zředěného roztoku se do šesti zkumavek přenese dvakrát po 0,3 ml, dvakrát po 0,5 ml a dvakrát po 1,0 ml (3 reakční roztoky a 3 korekční roztoky).

Porovnávací roztoky. 0,150 g *acetylcholiniumchloridu R* se rozpustí v 10 ml *vody R* (základní roztok obsahující 15 g acetylcholiniumchloridu v litru).

Těsně před použitím se zředí 1 ml základního roztoku *vodou R* na 50 ml (zředěný roztok (1): 300 μg acetylcholiniumchloridu v 1 ml).

Těsně před použitím se zředí 1 ml základního roztoku *vodou R* na 25 ml (zředěný roztok (2): 600 μg acetylcholiniumchloridu v 1 ml).

Zředěný roztok (1) se přenese do čtyř zkumavek; dvakrát po 0,1 ml a dvakrát po 0,4 ml (reakční roztoky a korekční roztoky).

Zředěný roztok (2) se přenese do čtyř dalších zkumavek; dvakrát po 0,6 ml a dvakrát po 1,0 ml (reakční a korekční roztoky).

Slepá zkouška. Použije se 1 ml *vody R* ve zkumavce (kontrolní roztok).

Postup. Tekutiny ve všech zkumavkách se zředí *vodou R* na 1,0 ml. Do zkumavek s korekčními roztoky a do zkumavky s kontrolním roztokem se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 4 mol/l RS*. Do všech zkumavek se pak přidají 2,0 ml *hydroxylamoniumchloridu alkalického RS*. Ponechá se reagovat přesně 2 min a pak se do zkumavek s reakčními roztoky přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 4 mol/l RS*. Dále se do všech zkumavek přidá 1,0 ml roztoku *chloridu železitého R* (100 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, zkumavky se uzavřou zátkou a třepáním se odstraní bubliny.

Měří se absorbance (*2.2.25*) všech roztoků při 540 nm proti kontrolnímu roztoku. Od hodnot absorbance reakčních roztoků se odečte absorbance příslušných korekčních roztoků. Z korigovaných hodnot absorbance čtyř porovnávacích roztoků se sestrojí kalibrační křivka (závislost korigované absorbance na obsahu acetylcholiniumchloridu) a na základě korigovaných hodnot absorbance zkoušených roztoků se odečte obsah acetylcholiniumchloridu ve zkoušených roztocích. Z odečtených tří hodnot se vypočítá průměr.

1 mol acetylcholiniumchloridu (181,7 g) odpovídá 1 molu O-acetylu (43,05 g).

2.5.20 Hexosaminy v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Spektrofotometrické stanovení hexosaminů; měří se intenzita vzniklého zbarvení po hydrolýze polysacharidu, acetylaci hexosaminu a jeho reakci s dimethylaminobenzaldehydem.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R*. Dále se roztok naředí tak, aby objemy použité ke zkoušce obsahovaly 125 μg až 500 μg glukosaminu (hexosaminu). Ze zředěného roztoku se 1,0 ml přenese do kalibrované zkumavky.

Porovnávací roztoky. 60 mg *glukosamoniumchloridu R* se rozpustí ve 100 ml *vody R* (základní roztok obsahující 0,500 g/l glukosaminu). Do čtyř kalibrovaných zkumavek se přenese 0,25 ml, 0,50 ml, 0,75 ml a 1,0 ml základního roztoku.

Slepá zkouška. Použije se 1 ml *vody R* ve zkumavce (kontrolní roztok).

Roztoky ve všech zkumavkách se zředí *vodou R* na 1 ml. Do každé zkumavky se přidá 1 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (292 g/l). Zkumavky se uzavřou zátkou a zahřívají se 1 h ve vodní lázni. Po vychladnutí na pokojovou teplotu se do každé zkumavky přidá 0,05 ml roztoku *thymolftaleinu R* (5 g/l) v *lihu 96% R* a dále se přidává roztok *hydroxidu sodného R* (200 g/l) až do vzniku modrého zabarvení. Potom se přidává do každé zkumavky *kyselina chlorovodíková 1 mol/l RS*, dokud se roztok neodbarví. Obsah každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10 ml (neutralizované hydrolyzáty).

Do druhé řady kalibrovaných 10ml zkumavek se přenese 1 ml každého neutralizovaného hydrolyzátu. Přidá se 1 ml acetylacetonového zkoumadla (čerstvě připravená směs obsahující 1 objemový díl *acetylacetonu R* a 50 objemových dílů roztoku *uhličitanu sodného bezvodého R* (53 g/l)) do každé zkumavky. Zkumavky se uzavřou zátkou a zahřívají 45 min ve vodní lázni při 90 °C a potom se ochladí na pokojovou teplotu. Do každé zkumavky se přidá 2,5 ml *lihu 96% R* a 1,0 ml roztoku dimethylaminobenzaldehydu (čerstvě připravený roztok: 0,8 g *dimethylbenzaldehydu R* se rozpustí v 15 ml *lihu 96% R* a přidá se 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R*) a obsah každé zkumavky se zředí *lihem 96% R* na 10 ml. Zkumavky se uzavřou, obsah se promíchá obracením zkumavek a 90 min se ponechá ve tmě. Pak se změří absorbance (*2.2.25*) každého roztoku při 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

Sestrojí se kalibrační křivka vynesením absorbance čtyř porovnávacích roztoků proti obsahu hexosaminu, ze které se odečte množství hexosaminu ve zkoušeném roztoku.

2.5.21 Methylpentosy v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Spektrofotometrické stanovení methylpentos; měří se intenzita zbarvení po hydrolýze polysacharidu a reakci s cysteiniumchloridem.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R*. Dále se roztok zředí tak, aby objemy použité ke zkoušce obsahovaly 2 μg až 20 μg rhamnosy (methylpentosy). 0,25 ml, 0,50 ml a 1,0 ml zředěného roztoku se převede do tří zkumavek.

Porovnávací roztoky. 0,100 g *rhamnosy R* se rozpustí ve 100 ml *vody R* (základní roztok obsahující 1 g/l methylpentosy). Těsně před použitím se 1 ml základního roztoku zředí *vodou R* na 50 ml (zře-

děný roztok obsahující 20 mg/l methylpentosy). Do pěti zkumavek se přenese 0,10 ml, 0,25 ml, 0,50 ml, 0,75 ml a 1,0 ml zředěného roztoku.
Slepá zkouška. Použije se 1 ml *vody R* ve zkumavce (kontrolní roztok).

Postup. Obsah všech zkumavek se zředí *vodou R* na 1 ml. Zkumavky se vloží do lázně s ledovou vodou a postupně se za stálého míchání po kapkách přidává do každé zkumavky 4,5 ml zchlazené směsi obsahující 1 objemový díl *vody R* a 6 objemových dílů *kyseliny sírové R*. Zkumavky se pak zahřejí na pokojovou teplotu a na několik minut se vloží do vodní lázně a ochladí se na pokojovou teplotu. Do každé zkumavky se přidá 0,10 ml čerstvě připraveného roztoku *cysteiniumchloridu R* (30 g/l). Protřepe se a ponechá 2 h stát.

Měří se absorbance (*2.2.25*) každého roztoku při 396 nm a 430 nm proti kontrolnímu roztoku. Pro každý roztok se vypočítá rozdíl hodnot absorbancí měřených při 396 nm a 430 nm. Ze zjištěných rozdílů absorbancí pro pět porovnávacích roztoků se sestrojí kalibrační křivka (závislost rozdílu absorbancí na obsahu methylpentosy), ze které se odečte obsah methylpentosy v každém zkoušeném roztoku. Ze zjištěných hodnot se vypočítá průměr.

2.5.22 Kyseliny uronové v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Spektrofotometrické stanovení uronových kyselin; měří se intenzita zbarvení vzniklého po reakci s karbazolem.

Zkoušený roztok. Použije se odměrná baňka vhodného objemu, aby bylo možno připravit roztok přípravku obsahující asi 5 mg/ml suchého polysacharidu. Do této baňky se kvantitativně přenese obsah lahvičky (ampule) přípravku a zředí se na potřebný objem *vodou R*. Dále se roztok zředí tak, aby objemy použité ke zkoušce obsahovaly 4 μg až 40 μg kyseliny glukuronové (kyseliny uronové). 0,25 ml, 0,50 ml a 1,0 ml tohoto roztoku se přenese do tří zkumavek.
Porovnávací roztoky. 50 mg *sodné soli kyseliny glukuronové R* se rozpustí ve 100 ml *vody R* (základní roztok kyseliny glukuronové 0,4 g/l). Těsně před použitím se 5 ml základního roztoku zředí *vodou R* na 50 ml (zředěný roztok kyseliny glukuronové 40 mg/l). 0,10 ml, 0,25 ml, 0,50 ml, 0,75 ml a 1,0 ml tohoto roztoku se převede do pěti zkumavek.
Slepá zkouška. Použije se 1 ml *vody R* ve zkumavce (kontrolní roztok).

Postup. Obsah všech zkumavek se zředí *vodou R* na 1 ml. Zkumavky se vloží do lázně s ledovou vodou a do každé zkumavky se přidává po kapkách za stálého míchání 5,0 ml *tetraboritanu sodného v kyselině sírové RS*. Zkumavky se uzavřou, vloží na 15 min do vodní lázně a ochladí se na pokojovou teplotu. Do každé zkumavky se přidá 0,20 ml roztoku *karbazolu R* (1,25 g/l) v *ethanolu R*. Zkumavky se uzavřou a vloží se na 15 min do vodní lázně a potom se ochladí na pokojovou teplotu. Potom se měří absorbance (*2.2.25*) každého roztoku při 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

Sestrojí se kalibrační křivka vynesením absorbance pěti porovnávacích roztoků proti jejich obsahu kyseliny glukuronové a z křivky se odečte množství kyseliny glukuronové v každém zředění zkoušeného roztoku. Ze zjištěných hodnot se vypočítá průměr.

2.5.23 Kyselina sialová v polysacharidových vakcínách

Podstata zkoušky. Po ultrafiltraci přípravku se stanoví kyselina sialová spektrofotometricky měřením intenzity zbarvení roztoku po reakci se zkoumadlem resorcinolovým a vytřepání do organického rozpouštědla.

Zkoušený roztok. Obsah jedné nebo více lahviček (ampulí) zkoušeného přípravku se kvantitativně přenese do odměrné baňky vhodného objemu. Zředí se na potřebný objem *vodou R* tak, aby vznikl roztok polysacharidu o známé koncentraci asi 250 µg/ml. Za použití injekční stříkačky se přenesou 4,0 ml tohoto roztoku do 10ml ultrafiltrační kyvety vhodné pro průchod molekul o relativní molekulové hmotnosti menší než 50 000. Stříkačka se dvakrát propláchne *vodou R* a promývací tekutina se přenese do ultrafiltrační kyvety. Ultrafiltrace se provádí za stálého míchání pod dusíkem a při tlaku asi 150 kPa. Pokaždé, když objem kapaliny v kyvetě klesne na 1 ml, se kyveta znovu naplní *vodou R* a pokračuje se, dokud není zfiltrováno 200 ml a zbytek v kyvetě je asi 2 ml. Zbylá tekutina se z kyvety přenese stříkačkou do 10ml odměrné baňky. Kyveta se promyje třikrát 2 ml *vody R*, promývací tekutina se přidá do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 10,0 ml (zkoušený roztok). Do každé ze dvou zkumavek se přenesou 2,0 ml zkoušeného roztoku.
Porovnávací roztoky. Použijí se porovnávací roztoky předepsané v článku. Připraví se dvě řady po třech zkumavkách a do zkumavek každé řady se přenese 0,5 ml, 1,0 ml a 1,5 ml porovnávacího roztoku odpovídajícího typu zkoušené vakcíny. Obsah každé zkumavky se zředí *vodou R* na 2,0 ml.
Slepá zkouška. Do dvou zkumavek se přenese po 2,0 ml *vody R* (kontrolní roztoky).

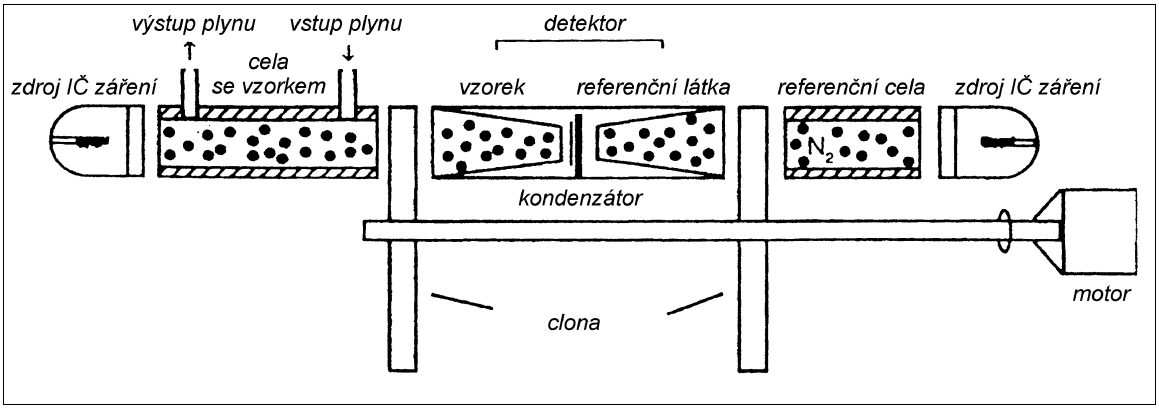
Postup. Do všech zkumavek se přidá po 5,0 ml *zkoumadla resorcinolového R*, zkumavky se zahřívají 15 min při 105 °C, ochladí se studenou vodou a přemístí se do lázně s ledovou vodou. Do každé zkumavky se přidá 5 ml *isoamylakoholu R,* důkladně se promíchá a zkumavky se ponechají 15 min v lázni s ledovou vodou. Zkumavky se odstřeďují a ponechají se v lázni s ledovou vodou do spektrofotometrického měření. Měří se absorbance (*2.2.25*) každé supernatantní tekutiny při 580 nm a 450 nm proti *isoamylalkoholu R*. Pro každou vlnovou délku se vypočte absorbance jako průměr hodnot naměřených u dvou stejných roztoků a od těchto hodnot se odečte průměrná hodnota zjištěná u kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce.

Sestrojí se graf ukazující rozdíl mezi absorbancí porovnávacího roztoku při 580 nm a 450 nm jako funkce obsahu kyseliny sialové (kyseliny N-acetylneuraminové) a z grafu se odečte množství kyseliny sialové ve zkoušeném roztoku.

2.5.24 Oxid uhličitý v medicinálních plynech

Oxid uhličitý v medicinálních plynech se stanoví pomocí infračerveného analyzátoru, viz obrázek 2.5.24-1.

Infračervený analyzátor obsahuje systém generující dva stejné infračervené paprsky, je tvořen dvěma elektricky regulovatelnými zdroji infračerveného záření a dvěma reflektory. Jeden paprsek prochází celou se vzorkem, kterým je proudící zkoušený plyn. Druhý paprsek prochází referenční celou naplněnou *dusíkem R1.* Dvě komůrky detektoru jsou naplněny *oxidem uhličitým R1* a záření je v nich automaticky selektivně zachycováno. Pohlcováním záření emitovaného oxidem uhličitým ve zkoušeném vzorku vzniká v komůrkách rozdílné množství tepla a tím dochází v obou komůrkách k rozdílné expanzi plynu. Tlakový rozdíl mezi oběma komůrkami detektoru způsobuje prohnutí kovové membrány, která odděluje komůrky od sebe. Tato membrána je součástí kondenzátoru, jehož kapacita se mění s rozdílem tlaku v obou komůrkách a závisí na obsahu oxidu uhličitého ve zkoušeném plynu. Jelikož infračervený paprsek je periodicky přerušován rotační clonou, výsledný elektrický signál je kmitočtově modulován a přesně měřen.

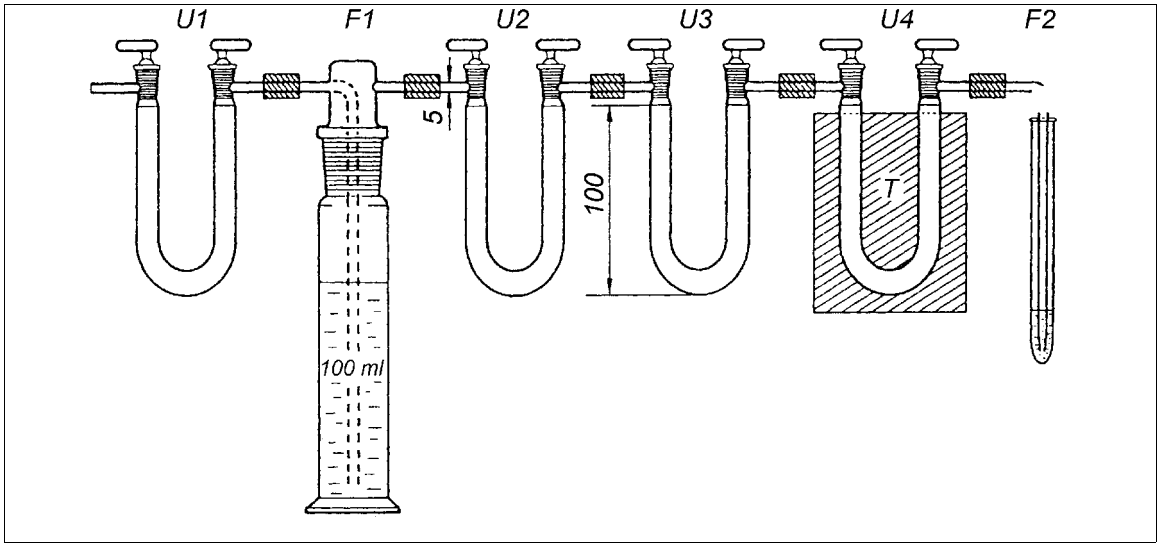


Obr. 2.5.24-1 Infračervený analyzátor

2.5.25 Oxid uhelnatý v medicinálních plynech

Metoda I

Zařízení. Zařízení, viz obrázek 2.5.25-1, se skládá z následujících částí vzájemně sériově spojených:



Obr. 2.5.25-1 Zařízení pro stanovení oxidu uhelnatého v medicinálních plynech
Rozměry v milimetrech.

- U-trubice (U_1) obsahující *silikagel bezvodý R* impregnovaný *oxidem chromovým R*,
- promývačka (F_1) obsahující 100 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (400 g/l),
- U-trubice (U_2) obsahující *hydroxid draselný R* v pecičkách,
- U-trubice (U_3) obsahující *oxid fosforečný R* nanesený na předem vyžíhanou a rozdrcenou pemzu,
- U-trubice (U_4) obsahující 30 g předem při 200 °C vysušeného rekrystalovaného *oxidu jodičného R* v granulích. Oxid jodičný je do trubice naplněn po 1cm vrstvách oddělených od sebe

vrstvami skleněné vaty stejné délky tak, aby účinná délka kolony byla 5 cm. Trubice je opatřena termostatem (*T*), kterým se při zkoušce udržuje teplota na 120 °C,

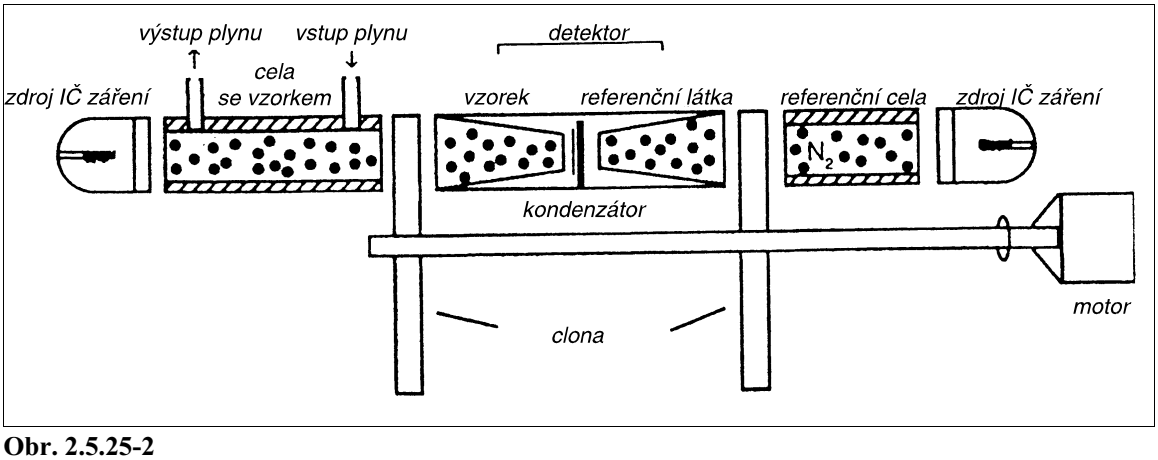
- reakční trubice (F_2) obsahující 2,0 ml *jodidu draselného RS* a 0,15 ml *škrobu R*.

Postup. Zařízením se nechá projít 5,0 l *argonu R* a případně vzniklé modré zbarvení roztoku jodidu se odstraní přídavkem nejmenšího potřebného množství čerstvě připraveného *thiosíranu sodného 0,002 mol/l VS*. V promývání se pokračuje tak dlouho, dokud spotřeba *thiosíranu sodného 0,002 mol/l VS* po průchodu 5,0 l *argonu R* není nižší než 0,045 ml. Pak se zařízením nechá procházet zkoušený plyn z tlakové lahve, jehož objem a průtoková rychlost jsou předepsány v příslušném článku. Zbytky uvolněného jodu v reakční trubici se potom vymyjí průchodem 1,0 l *argonu R* zařízením. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,002 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška za použití předepsaného objemu *argonu R*. Spotřeba *thiosíranu sodného 0,002 mol/l VS* korigovaná spotřebou při slepé zkoušce není větší, než je předepsaný limit.

Metoda II

Oxid uhelnatý v medicinálních plynech se stanoví pomocí infračerveného analyzátoru, viz obrázek 2.5.25-2.

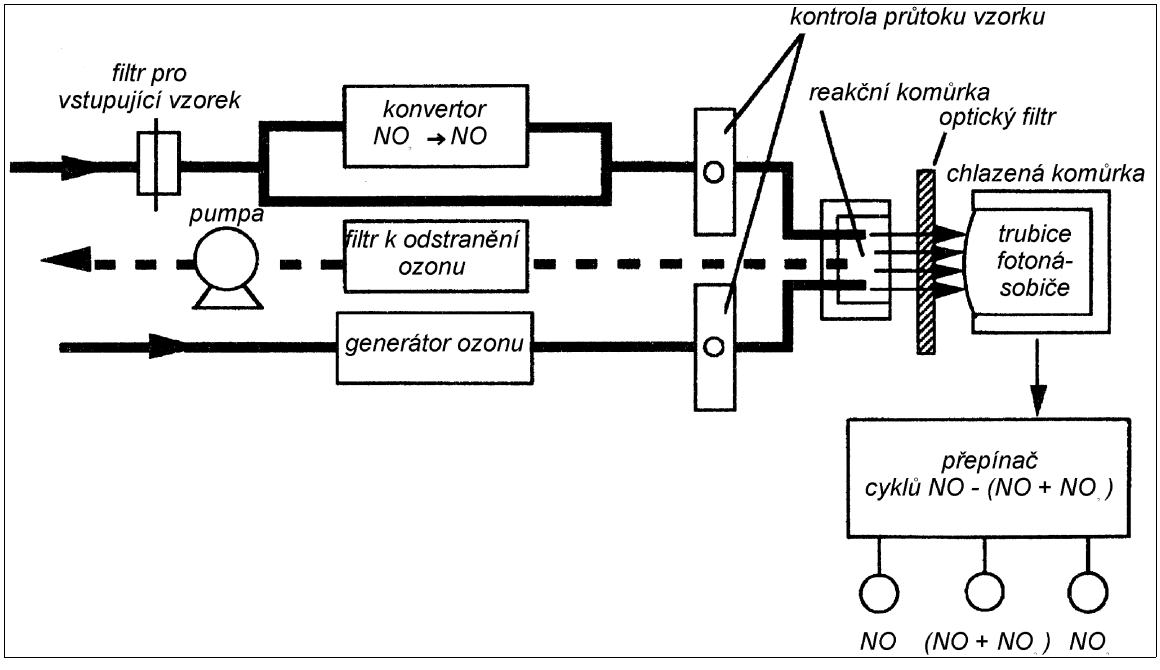
Infračervený analyzátor obsahuje systém generující dva stejné infračervené paprsky, je tvořen dvěma elektricky regulovatelnými zdroji infračerveného záření a dvěma reflektory. Jeden paprsek prochází celou se vzorkem, kterým je proudící zkoušený plyn. Druhý paprsek prochází referenční celou naplněnou *dusíkem R1*. Dvě komůrky detektoru jsou naplněny *oxidem uhelnatým R1* a záření je v nich automaticky selektivně zachycováno. Pohlcováním záření emitovaného oxidem uhelnatým ve zkoušeném vzorku vzniká v komůrkách rozdílné množství tepla a tím dochází v obou komůrkách k rozdílné expanzi plynu. Tlakový rozdíl mezi oběma komůrkami detektoru způsobuje prohnutí kovové membrány, která odděluje komůrky od sebe. Tato membrána je součástí kondenzátoru, jehož kapacita se mění s rozdílem tlaku v obou komůrkách a závisí na obsahu oxidu uhelnatého ve zkoušeném plynu. Jelikož infračervený paprsek je periodicky přerušován rotační clonou, výsledný elektrický signál je kmitočtově modulován a přesně měřen.



Obr. 2.5.25-2

2.5.26 Oxid dusnatý a oxid dusičitý v medicinálních plynech

Oxid dusnatý a oxid dusičitý v medicinálních plynech se stanoví pomocí chemiluminiscenčního analyzátoru, viz obrázek 2.5.26-1.



Obr. 2.5.26-1 Chemiluminiscenční analyzátor

Přístroj se skládá z následujících částí:
- zařízení pro filtraci, nastavení a kontrolu průtoku zkoušeného plynu,
- konvertoru, který redukuje oxid dusičitý na oxid dusnatý pro stanovení součtu obsahů oxidu dusnatého a oxidu dusičitého; obsahuje nerezovou, skleněnou nebo křemennou pícku udržovanou na teplotě nepřevyšující 550 °C,
- generátoru ozonu s kontrolovanou průtokovou rychlostí plynu; ozon se vytváří působením elektrických výbojů mezi dvěma elektrodami s přiloženým vysokým napětím. Do ozonového generátoru se přivádí buď čistý kyslík, nebo vysušený atmosférický vzduch a koncentrace takto získaného ozonu musí značně převyšovat maximální koncentraci všech stanovovaných oxidů dusíku,
- komůrky, v níž reaguje oxid dusnatý s ozonem,
- systému pro detekci světelného záření emitovaného při vlnové délce 1,2 μm, sestávajícího ze selektivního optického filtru a fotonásobiče.

2.5.27 Kyslík v medicinálních plynech

Kyslík v medicinálních plynech se stanoví pomocí paramagnetického analyzátoru.

Princip metody je založen na vysoké paramagnetické citlivosti kyslíkové molekuly. Kyslík vykazuje silnou interakci na magnetická pole, která se měří elektronicky, zesilují se a převádějí na odečty koncentrace kyslíku. Měření koncentrace kyslíku závisí na teplotě a tlaku. Jestliže analyzátor není automaticky kompenzován na změny teploty a tlaku, musí být těsně před použitím kalibrován. Protože paramagnetický vliv kyslíku je lineární, musí mít přístroj vhodný rozsah s možností odečtu koncentrace na 0,1 % nebo přesnější.

Kalibrace přístroje. Nastavení se provede následujícím způsobem:
- nula se nastaví po dosažení konstantního odečtu při průchodu *dusíku R1* přístrojem při vhodné průtokové rychlosti. Nastavení by mělo být provedeno v souladu s instrukcí výrobce,

- příslušná limitní hodnota se nastaví při průchodu vzduchu (20,9 % O_2 *V/V*) přístrojem při vhodné průtokové rychlosti po dosažení konstantního odečtu. Limitní hodnota by měla být nastavena na 20,9 % kyslíku *V/V* v souladu s instrukcí výrobce.

Stanovení obsahu. Zkoušený plyn se nechá procházet přístrojem konstantní průtokovou rychlostí tak dlouho, dokud se nedosáhne vyhovujícího odečtu.

2.5.28 Voda v medicinálních plynech

Voda v medicinálních plynech se stanoví pomocí elektrolytického hygrometru popsaného níže.

Měřicí celu tvoří tenká vrstva oxidu fosforečného mezi dvěma stočenými platinovými dráty, které působí jako elektrody. Vodní pára ze zkoušeného plynu je absorbována oxidem fosforečným za tvorby elektricky vodivé kyseliny fosforečné. Elektrické napětí přiváděné kontinuálně na elektrody vyvolává elektrolýzu vody a tím regeneruje oxid fosforečný. Měří se vznikající elektrický proud, jehož velikost je úměrná množství vody ve zkoušeném plynu. Systém je samokalibrační vzhledem k platnosti Faradayova zákona.

Odebere se vzorek zkoušeného plynu a nechá se temperovat při pokojové teplotě. Měřicí cela se čistí, dokud se nedosáhne stabilního odečtu na stupnici přístroje. Změří se obsah vody ve zkoušeném plynu a překontroluje se stálost teploty zařízení umístěného na vstupu do přístroje.

2.5.29 Oxid siřičitý

150 ml *vody R* se převede do baňky (A), viz obr. 2.5.29-1, str. 195, a celým systémem se nechá 15 min proudit *oxid uhličitý R* průtokovou rychlostí 100 ml/min. Do zkumavky (D) se převede 10 ml *peroxidu vodíku zředěného RS* neutralizovaného po přidání roztoku *modři bromfenolové R* (1 g/l) v *lihu R* 20% *(V/V)*. Bez přerušení proudu oxidu uhličitého se odstraní nálevka (B) a pomocí 100 ml *vody R se* hrdlem převede do baňky (A) 25,0 g zkoušené látky. Nálevkou se přidá 80 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vaří se 1 h. Pak se otevře uzávěr nálevky, přeruší se proud oxidu uhličitého, zahřívání a chlazení vodou. Obsah zkumavky se převede pomocí malého množství *vody R* do 200ml kuželové širokohrdlé baňky, zahřívá se 15 min na vodní lázni a ochladí se. Přidá se 0,1 ml roztoku *modři bromfenolové R* (1 g/l) v *lihu R* 20% (*V/V*) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na fialově modré.

Obsah oxidu siřičitého (SO_2) v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$128a\ ,$$

v němž značí:

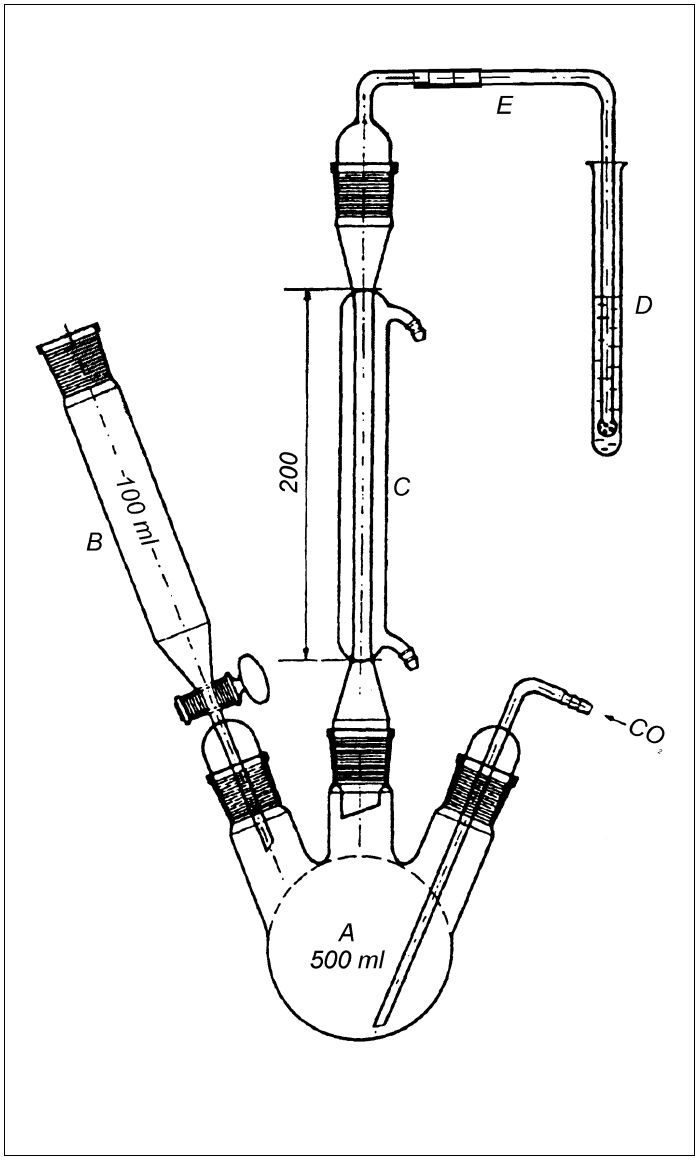
a - spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* v mililitrech.

2.5.30 Oxidanty

4,0 g se převedou do 125ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 50,0 ml *vody R*, baňka se uzavře a směs se 5 min míchá. Pak se obsah baňky převede do 50ml odstřeďovací zkumavky se skleněnou zátkou a odstřeďuje se. 30,0 ml čiré supernatantní tekutiny se převede do 125ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 1 ml *kyseliny octové ledové R* a 0,5 g až 1,0 g *jodidu draselného R*, baňka se uzavře a roztok se důkladně promíchá. Nechá se stát 25 min až 30 min ve tmě. Pak se přidá 1 ml *škrobu RS* a titruje se *thiosíranem sodným 0,002 mol/l VS* do odbarvení. Provede se slepá zkouška.

Spotřeba je nejvýše 1,4 ml *thiosíranu sodného 0,002 mol/l VS* (0,002 %, počítáno jako H_2O_2).

1 ml *thiosíranu sodného 0,002 mol/l VS* odpovídá 34 μg oxidantu, počítáno jako peroxid vodíku.



Obr. 2.5.29-1 Přístroj na stanovení oxidu siřičitého
Rozměry v milimetrech.

2.6 Biologické zkoušky

2.6.1 Zkouška na sterilitu

Tato zkouška se provádí s léčivými látkami, pomocnými látkami, léčivými přípravky a zdravotnickými materiály, u nichž je lékopisem předepsána sterilita. Vyhovující výsledek však pouze udává, že zkoušený vzorek není znečištěn žádným mikrobem zjistitelným v podmínkách zkoušky. Stupeň záruky poskytnutý nepřítomností znečišťujících jednotek ve vzorku ve vztahu ke kvalitě šarže je funkcí účinnosti přijatého plánu vzorkování. Rozšíření platnosti výsledku na celou šarži výrobku předpokládá záruku, že přípravek byl vyroben za homogenních podmínek, což závisí na opatřeních v průběhu výroby.

Pokud se přípravek sterilizuje v uzavřených konečných obalech, vyšší stupeň záruky než provedení zkoušky na sterilitu poskytuje sledování správného průběhu sterilizace celé šarže pomocí měření a automatického zaznamenávání hodnot biologicky opodstatněných fyzikálních parametrů.

Zkouška na sterilitu je jedinou analytickou metodou vhodnou pro zkoušení přípravků vyrobených za aseptických podmínek a jedinou analytickou metodou platnou pro úřední autoritu, která zkouší přípravek na sterilitu.

Podstata zkoušky. Na vybraných půdách se za stanovených podmínek kultivace zjišťuje, zda zkoušený přípravek obsahuje mikroorganismy schopné pomnožení v daných podmínkách.

Opatření proti mikrobiálnímu znečištění

Zkouška na sterilitu se provádí za podmínek zabraňujících náhodnému znečištění v průběhu zkoušky, např. použitím sterilního boxu s laminárním prouděním vzduchu. Opatření proti náhodnému znečištění nesmí inaktivovat mikroorganismy, které mají být zjištěny zkouškou.

Je nutno pravidelně ověřovat pracovní podmínky zkoušky kontrolou vzduchu a povrchů pracovního prostředí a souběžnou kontrolou přípravků, jejichž sterilita je známa.

Výběr živné půdy

Vhodné půdy pro aeroby, anaeroby a houby a způsob jejich přípravy jsou popsány níže. Mohou se použít jiné půdy, u nichž je prokázána vhodnost pro kultivaci široké oblasti mikroorganismů. Půdy odpovídají následujícím zkouškám, provedeným s každou šarží před nebo souběžně se zkouškou provedenou u zkoušených přípravků.

Sterilita. Půdy určené zejména k průkazu bakterií se inkubují při teplotě 30 °C až 35 °C a půdy určené zejména k průkazu hub se inkubují při teplotě 20 °C až 25 °C po dobu nejméně 7 dní. Není pozorován růst mikroorganismů.

Živné vlastnosti. Zkumavky s vybranými půdami se naočkují dávkou asi 100 živých mikroorganismů (aeroby, anaeroby a houby) a inkubují se při shora uvedených (odstavec Sterilita) teplotách nejdéle 7 dní.

Půdy jsou vhodné, jestliže v nich dojde k rychlému a mohutnému pomnožení mikroorganismů. Ke zkoušce se doporučují tyto testovací mikroorganismy:

Staphylococcus aureus, např.	ATCC 6538 P	CCM 2022
	CIP 53.156	CNCTC Mau 28/58
	NCTC 7447	
Bacillus subtilis, např.	ATCC 6633	CCM 1999
	CIP 52.62	CNCTC Bs 8/58
	NCIB 8054	

Clostridium sporogenes, např.	ATCC 19404	CCM 4409
	CIP 79.03	CNCTC Cl 66/79
Candida albicans, např.	ATCC 2091	CCM 8226
	CIP 1180.79	CNCTC 55/79

Účinnost půd v přítomnosti a nepřítomnosti zkoušeného přípravku

a) Do nejméně 4 zkumavek živné půdy nebo každé živné půdy použité pro zkoušku sterility se přidá množství zkoušeného přípravku, které bude použito ve zkoušce na sterilitu. (U catgutu nebo jiných chirurgických šicích materiálů se do každé zkumavky vloží 2 vlákna.) Polovina zkumavek se naočkuje 0,1 ml suspenze vhodného kmene (v případě antibiotik se použije kmen citlivý na antibiotikum) aerobního mikroorganismu, jako např. *Staphylococcus aureus*, zředěné tak, aby 1 ml obsahoval asi 1000 živých zárodků (naočkuje se tedy asi 100 zárodků) a druhá polovina zkumavek se naočkuje 0,1 ml suspenze spor vhodného kmene (v případě antibiotik se užije kmen citlivý na antibiotikum) anaerobního mikroorganismu, jako např. *Clostridium sporogenes*, zředěné tak, aby 1 ml obsahoval 1000 spor (naočkuje se asi 100 spor). Stejně se připraví skupina zkumavek bez přidání zkoušeného přípravku a naočkuje se stejným způsobem. Všechny zkumavky se inkubují při teplotě 30 °C až 35 °C po dobu nejvýše 7 dnů.

b) Do nejméně dvou zkumavek s půdou na kultivaci hub se přidá zkoušený přípravek ve stejném množství jako ve zkoušce na sterilitu (u catgutu nebo jiných chirurgických materiálů se na každou zkumavku použijí 2 vlákna). Zkumavky se naočkují 0,1 ml suspenze vhodného kmene (u antibiotik se použije kmen citlivý na antibiotikum) houby, jako např. *Candida albicans*, zředěné tak, aby 1 ml obsahoval asi 1000 živých zárodků (naočkuje se asi 100 zárodků). Stejně se připraví 2 zkumavky bez přidání zkoušeného přípravku a naočkují se stejným způsobem. Všechny zkumavky se inkubují při teplotě 20 °C až 25 °C nejdéle 7 dnů.

Jestliže se živná půda původně určená pro kultivaci hub používá také ke kultivaci bakterií, zkouší se oběma druhy mikroorganismů.

Pokud je během inkubace růst mikrobů ve zkumavkách se zkoušenou látkou i bez ní podobný (rychlý a mohutný), nemá látka protimikrobní účinek a zkoušku na sterilitu je možno provést bez modifikací. Jestliže je ve zkumavkách se zkoušenou látkou slabší nebo opožděný růst ve srovnání se zkumavkami bez této látky nebo jestliže ve zkumavkách se zkoušenou látkou nenastane růst, má tato látka protimikrobní účinek, který musí být odstraněn filtrací, zředěním nebo neutralizací před nebo v průběhu zkoušky na sterilitu. Účinnost odstranění protimikrobního účinku se ověří opakováním zkoušky.

Postup zkoušky na sterilitu

Zkouška může být provedena metodou membránové filtrace nebo přímým očkováním do živných půd. Pokud to povaha přípravku dovoluje, tj. u filtrovatelných vodných, lihových nebo olejových přípravků, u přípravků mísitelných nebo rozpustných ve vodných nebo olejových rozpustidlech, které samy v podmínkách zkoušky nemají žádný protimikrobní účinek, má se dát přednost metodě membránové filtrace.

Membránová filtrace

Používají se membránové filtry s jmenovitou velikostí pórů nejvýše 0,45 µm, jejichž účinnost zadržet mikroorganismy byla ověřena. Filtry např. z dusičnanů celulosy se používají pro vodné, olejové a slabě lihové roztoky, filtry např. z octanu celulosy se používají pro silně lihové roztoky.

Dále popsaná metoda je určena pro filtry o průměru asi 50 mm. Pokud se použijí filtry jiného průměru, měl by se jim přizpůsobit objem zřeďovacího i promývacího roztoku. Filtrační přístroj a membránové filtry se sterilizují vhodnými postupy. Přístroj je upraven tak, aby zkoušený roztok mohl být do něho naplněn a filtrován za aseptických podmínek a aby umožnil vyjmutí membránového filtru a jeho přenesení do živné půdy nebo aby po přidání živné půdy umožnil kultivaci.

Vodné roztoky. Na membránový filtr se přenese malé množství vhodné sterilní tekutiny, jako např. neutrální roztok masového nebo kaseinového peptonu (1 g/l), a zfiltruje se. Ihned poté se jedním nebo více filtry zfiltruje obsah zkoušené nádoby nebo nádob v množství podle tabulek 2.6.1-1 a 2.6.1-2. Obsah se, pokud je to nutné, zředí vybraným sterilním rozpustidlem asi na 100 ml. Má-li zkoušený roztok protimikrobní účinek, promyje se membránový filtr nejméně třikrát asi 100 ml vybraného sterilního rozpustidla, a pokud je to nutné, přidá se ke sterilnímu rozpustidlu nebo k živné půdě neutralizující látka. Membránový filtr se přenese do živné půdy nebo se asepticky rozdělí na dvě stejné části a každá z nich se přenese do vhodné půdy. Lze též nalít půdu na membránu v přístroji. Pokud není předepsáno jinak, inkubují se 7 dní při teplotě 30 °C až 35 °C půdy určené zejména k průkazu bakterií a při 20 °C až 25 °C půdy určené zejména k průkazu hub. (Pokud je podezření na možnou přítomnost mikroorganismů oslabených vlastnostmi látky nebo provedeným zpracováním, může kompetentní autorita prodloužit dobu inkubace).

Tab. 2.6.1-1 Množství zkoušeného vzorku pro zkoušku na sterilitu parenterálních přípravků

Obsah jednotlivé nádoby	Nejmenší množství použité pro jednotlivou půdu
Tekutiny	
méně než 1 ml	celý obsah nádoby
1 ml a více, méně než 4 ml	polovina obsahu nádoby
4 ml a více, méně než 20 ml	2 ml
20 ml až 100 ml	10 %, není-li předepsáno jinak.
více než 100 ml	10 %, nejméně však 50 ml, není-li předepsáno jinak.
Pevné látky	
méně než 50 mg	celý obsah nádoby
50 mg a více, méně než 200 mg	polovina obsahu nádoby
200 mg a více	100 mg

Rozpustné pevné látky. Na každou živnou půdu se použije podle tabulky 2.6.1-1 a 2.6.1-2 určené množství látky, které se rozpustí ve vhodném rozpustidle, jako je např. neutrální roztok masového nebo kaseinového peptonu (1 g/l), a postupuje se stejně jako u vodných roztoků za použití membránového filtru vhodného pro zvolené rozpustidlo.

Oleje a roztoky v olejích. Na každou živnou půdu se použije podle tabulky 2.6.1-1 a 2.6.1-2 určené množství látky. Oleje a roztoky v olejích s dostatečně nízkou viskozitou se filtrují přímo suchým membránovým filtrem. Viskózní oleje se mohou zředit vhodným sterilním ředidlem, jako je isopropylmyristat, u něhož je prokázáno, že v podmínkách zkoušky nemá protimikrobní vlastnosti. Olej se nechá proniknout membránovým filtrem vlastní tíží a tlak nebo sání se nastavují zvolna. Membránový filtr se promyje nejméně třikrát asi 100 ml vhodného sterilního roztoku, jako je např. neutrální roztok masového nebo kaseinového peptonu (1 g/l), obsahující (4-terc.oktylfenoxy)polyoxyethanol (1 g/l), nebo polysorbát 80 (10 g/l). Membránový filtr nebo filtry se přenesou

do živné půdy nebo živných půd, nebo naopak se k nim půda přidá, jak je uvedeno u vodných roztoků, a inkubují se při stejných teplotách po stejnou dobu.

Masti a krémy. Na každou živnou půdu se použije množství přípravku uvedené v tabulce 2.6.1-2. Masti s hydrofobním základem a emulze typu v/o se mohou ředit isopropylmyristatem až na koncentraci (10 g/l) a zahřívat, pokud je to potřeba, na nejvýše 40 °C (výjimečně až na 45 °C). Zfiltruje se tak rychle, jak je možné, a postupuje se, jak je popsáno u olejů a roztoků v oleji.

Přímé očkování do živných půd

Do živné půdy se dá takové množství zkoušeného přípravku, jaké je předepsáno tabulkami 2.6.1-1 a 2.6.1-2. Pokud není předepsáno jinak, je pro tekutiny poměr asi 1 : 10 a pro pevné látky asi 1 : 100.

Tab. 2.6.1-2 Množství zkoušeného vzorku pro zkoušku na sterilitu neparenterálních přípravků

Druh přípravku	Celkové spojené množství	Množství pro jednotlivou půdu
Pro membránovou filtraci		
vodné roztoky	10 ml až 100 ml	5 ml až 10 ml
jiné přípravky rozpustné ve vodě nebo isopropylmyristatu nebo jiném rozpustidle	1 g až 10 g	množství odpovídající 0,5 g až 1 g
Pro přímé očkování		
tekuté přípravky	10 ml až 100 ml	5 ml až 10 ml
rozpustné přípravky	1 g až 10 g	množství odpovídající 0,5 g až 1 g
nerozpustné přípravky, krémy a masti, jež je nutno suspendovat nebo emulgovat	1 g až 10 g	množství odpovídající 0,5 g až 1 g

Olejové tekutiny. Použijí se živné půdy, k nimž byl přidán roztok polysorbátu 80 (10 g/l) nebo (4-terc.oktylfenoxy)polyoxyethanol (1 g/l) nebo jiné emulgující látky ve vhodné koncentraci, u níž bylo prokázáno, že v podmínkách zkoušky nemá protimikrobní účinek.

Masti a krémy. Zředí se v poměru 1 : 10 vhodným emulgátorem ve sterilním rozpustidle, např. neutrálním roztokem masového nebo kaseinového peptonu (1 g/l). Zředěný přípravek se očkuje do živné půdy, která neobsahuje emulgující látku.

Má-li zkoušený přípravek protimikrobní účinek, provede se zkouška po neutralizaci vhodnou neutralizační látkou nebo po zředění dostatečným množstvím živné půdy. Je-li nutné použít větší objem přípravku, lze dát přednost použití koncentrované živné půdy připravené tak, aby se dosáhlo potřebného zředění. V některých případech lze koncentrovanou živnou půdu přidat přímo k přípravku v jeho obalu.

Pokud není předepsáno jinak, inkubují se naočkované živné půdy nejméně 14 dní, půdy určené zejména k průkazu bakterií při teplotě 30 °C až 35 °C, půdy určené zejména k průkazu hub při 20 °C až 25 °C. V průběhu inkubace se půdy několikrát prohlížejí. Půdy s olejovými přípravky se každý den opatrně protřepou. Pokud se však použije k důkazu anaerobů thioglykolanová nebo jí podobná půda, je nutno omezit třepání nebo míchání na minimum, aby byly zachovány anaerobní podmínky.

Odečítání a hodnocení výsledků

V živných půdách se v průběhu a na závěr inkubace makroskopicky zjišťuje případný růst mikrobů. Jestliže není pozorován žádný růst, vyhovuje zkoušený přípravek zkoušce na sterilitu. Je-li zjištěn růst, přípravek nevyhovuje zkoušce na sterilitu, pokud nebylo opakováním zkoušky nebo jinými prostředky zjištěno, že zkouška byla neplatná z důvodů, jež se nevztahují na zkoušený přípravek. K průkazu, že růst mikrobů v živné půdě nebyl způsoben vlastním znečištěním zkoušeného přípravku, ale znečištěním v průběhu zkoušky, je povoleno provést následující opakovací zkoušky.

První opakování. Počet vybraných vzorků a zkoušené množství jsou stejné jako při původní zkoušce. Není-li zjištěn růst mikrobů, zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu. Pokud se při prvním opakování zjistí v některé půdě růst mikrobů, izolují se a identifikují mikrobi a srovnají se s nálezem v původní zkoušce. Pokud se oba nálezy snadno nerozliší, zkoušený přípravek nevyhovuje zkoušce na sterilitu. Pokud se snadno rozliší, může se provést druhé opakování.

Druhé opakování. Použije se dvojnásobek vzorků oproti původní zkoušce a z každého vzorku se odebere stejné množství jako při původní zkoušce. Není-li zjištěn růst mikrobů, zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu. Pokud se při druhém opakování zjistí růst, zkoušený přípravek nevyhovuje zkoušce na sterilitu.

Postup zkoušky pro parenterální přípravky

Pokud se použije metoda membránové filtrace, zkouší se, pokud možno, celý obsah nádoby, ale nejméně množství uvedené v tabulce 2.6.1-1. Je-li nutno, zředí se asi na 100 ml vhodným sterilním roztokem, např. neutrálním roztokem masového nebo kaseinového peptonu (1 g/l).

Pokud se použije metoda přímého očkování do živné půdy, očkuje se množství uvedené v tabulce 2.6.1-1. Zkoušky na bakteriální a houbovou sterilitu se provádějí se stejným vzorkem zkoušeného přípravku. Pokud objem nebo množství v jedné nádobě nestačí k provedení obou zkoušek, použije se obsah ze dvou nebo více nádob k naočkování různých půd. Je-li objem tekutiny v nádobě větší než 100 ml, měla by se použít membránová filtrace s ohledem na skutečnost, že celkový objem filtrovaný jedním filtrem nesmí překročit 1000 ml.

Postup zkoušky pro oční a jiné neparenterální přípravky s požadavkem sterility

Pro membránovou filtraci a přímé očkování do půd se použije obsah přiměřeného počtu nádob nebo postačující části obsahu odebrané z jednotlivých nádob tak, aby byl získán homogenní vzorek v rozmezí uvedeném v tabulce 2.6.1-2 jako Celkové spojené množství. Pro každou živnou půdu se ze smíšeného vzorku použije Množství pro jednotlivou půdu, uvedené v tabulce 2.6.1-2.

Postup zkoušky pro chirurgický obvazový materiál

Zkoušený vzorek. Ochranný obal se otevře za aseptických podmínek, ve sterilním boxu nebo jiném místě, např. v prostoru s laminárním prouděním sterilního vzduchu, a z různých míst balení se odeberou pro každou živnou půdu 3 vzorky. U bavlněné vaty, buničité vaty nebo podobných netkaných materiálů má být jejich hmotnost nejméně 1 g, u tkaných materiálů a náplastí má být jejich plocha asi 10 cm^2. U řezaných gázových roušek, ať jsou či nejsou individuálně baleny, se z různých míst hromadného balení odeberou pro každou živnou půdu 3 celé roušky. Použije se takové množství půdy (20 ml až 150 ml), aby celý vzorek byl ponořen. Při prvním nebo druhém opakování zkoušky se odebírá stejný počet vzorků z jiného, čerstvě otevřeného balení.

Očkování do živné půdy. Pro každou živnou půdu se použijí 3 nádoby a do každé z nich se ponoří jeden vzorek.

Vyloučení protimikrobních vlastností. Jestliže při ověřování účinnosti živných půd je potlačen růst testovacího mikroorganismu přítomností zkoušeného vzorku, opakuje se zkouška na sterilitu buď za použití vhodné inaktivační látky, nebo, pokud to povaha materiálu dovoluje, níže popsanou metodou membránové filtrace.

Membránová filtrace. Každý vzorek se protřepává 10 min nejméně v 50 ml živné půdy obsahující lecithin (0,7 g/l) a polysorbát 80 (5 g/l). Ihned se zfiltruje sterilním membránovým filtrem, předem zvlhčeným stejnou živnou půdou, tolik výtřepku, kolik projde filtrem. Filtr se promyje nejméně třemi po sobě následujícími dávkami po 50 ml vhodné sterilní tekutiny, jako je např. neutrální roztok masového nebo kaseinového peptonu (1 g/l), a membrána se přenese do nádoby se živnou půdou vybranou pro zkoušku.

Postup zkoušky pro catgut a jiný chirurgický šicí materiál

Zkouška se provádí tak, jak je předepsáno u chirurgických obvazů, s následujícími změnami.

Zkoušený vzorek. Použije se celá nit z čerstvě otevřeného balení. Je-li nutné provést druhé opakování zkoušky, opakuje se se stejným počtem nití jako v původní zkoušce (tj. 5 nití). Každý vzorek se odebere z jiného, čerstvě otevřeného balení.

Očkování do živných půd. Každá nit se vloží samostatně do nádoby se živnou půdou. Pro každý druh půdy se použije 5 nádob. Použije se takové množství půdy (20 ml až 150 ml), aby zkoušený materiál byl ponořen. U balení s více nitěmi se odebírá 5 nití z pěti různých balení.

Účinnost živných půd za přítomnosti a za nepřítomnosti zkoušeného vzorku. Ověří se živné vlastnosti každé šarže půdy a zajistí se neutralizace inhibičních účinků, vyvolaných např. sterilizačními metodami nebo složkami zvláčňujících tekutin. Nejméně 2 nádoby každé živné půdy se naočkují testovacími mikroorganismy. Nádoby obsahují 2 nitě a nejméně 2 nádoby jsou bez nití. Půdy s bakteriemi se inkubují při teplotě 30 °C až 35 °C a půdy s houbami při teplotě 20 °C až 25 °C po dobu nejvýše 7 dní. Pokud je růst mikroorganismů během inkubace podobný (rychlý a mohutný) v přítomnosti i v nepřítomnosti zkoušeného přípravku, nemá přípravek protimikrobní účinek a zkouška může být provedena bez modifikace. Jestliže růst není podobný, zkouška se opakuje po vhodné neutralizaci nebo vyloučení inhibičního účinku.

Inkubace. Inkubuje se nejméně 14 dní při teplotě 30 °C až 35 °C pro aerobní a anaerobní bakterie a při teplotě 20 °C až 25 °C pro houby.

Nejmenší počet vzorků pro zkoušku na sterilitu doporučených ke zkoušení v poměru k počtu jednotek v šarži

Pokud je v článku uvedeno, aby léčivá látka, pomocná látka, léčivý přípravek nebo zdravotnický materiál vyhověl zkoušce na sterilitu, vztahuje se tento požadavek na každou jednotku zkoušené šarže. Proto se zkouší dostatečný počet vzorků, aby výsledek zkoušky měl potřebný stupeň spolehlivosti. Pro zkoušku na sterilitu se pod pojmem šarže rozumí homogenní soubor uzavřených nádob, které byly připraveny tak, že nebezpečí znečištění je pro každou její jednotku stejné. Nejmenší počet vzorků, který je doporučen ke zkoušení a je uveden v tabulce 2.6.1-3, předpokládá, že výrobek byl na všech stupních výroby zpracován za podmínek vylučujících znečištění. Při použití tohoto doporučení je třeba vzít v úvahu objem přípravku v nádobě, validaci sterilizační metody a jakékoliv další zvláštnosti vztahující se k výrobku.

Tab. 2.6.1-3

Počet jednotek v šarži	Nejmenší počet zkoušených vzorků
Parenterální přípravky	
ne více než 100 nádob	10 % nebo 4 nádoby, podle toho, co je více.
více než 100, ale ne více než 500 nádob	10 nádob
více než 500 nádob	2 % nebo 20 nádob, podle toho, co je méně.
Oční a ostatní neparenterální přípravky	
ne více než 200 nádob	5 % nebo 2 nádoby, podle toho, co je více.
více než 200 nádob	10 nádob
Pokud je přípravek v jednodávkovém obalu, použije se tabulka pro parenterální přípravky.	
Chirurgické obvazové materiály	
ne více než 100 balení	10 % nebo 4 balení, podle toho, co je více.
více než 100, ale ne více než 500 balení	10 balení
více než 500 balení	2 % nebo 20 balení, podle toho, co je méně.
Catgut a jiný chirurgický šicí materiál	
ne více než 1000 balení	2 % nebo 5 balení, podle toho, co je více.
z každých dalších 1000 balení	další 2 balení až do nejvyššího celkového počtu 40 balení.
Velká balení pevných výrobků	
do 4 balení	každé balení
více než 4, ale ne více než 50 balení	20 % nebo 4 balení, podle toho, co je více.
více než 50 balení	2 % nebo 10 balení, podle toho, co je více.

Živné půdy doporučené pro zkoušku na sterilitu

Následující živné půdy byly shledány vhodnými pro zkoušku na sterilitu. Thioglykolanová půda je především určena pro kultivaci anaerobních bakterií, ale umožní objevit také aerobní bakterie. Půda ze sójového a kaseinového hydrolyzátu je především určena pro kultivaci aerobních bakterií, ale je vhodná i pro kultivaci hub. Mohou se používat i jiné živné půdy, pokud podporují růst široké řady mikroorganismů a pokud vyhovují zkoušce na růstové vlastnosti za přítomnosti zkoušeného přípravku.

Thioglykolanová půda

L-cystin	0,5 g
agar granulovaný (obsah vlhkosti do 15 %)	0,75 g
chlorid sodný	2,5 g
glukosa monohydrát	5,5 g
kvasničný výtažek (rozpustný ve vodě)	5,0 g

pankreatický hydrolyzát kaseinu	15,0 g
thioglykolan sodný nebo	0,5 g
kyselina thioglykolová	0,3 g
roztok sodné soli resazurinu (1 g/l) čerstvě připravený	1,0 ml
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 7,1 ± 0,2.

Agar se rozpustí varem ve vodě. Pak se L-cystin rozpustí v asi 6 ml roztoku hydroxidu sodného 1 mol/l a přidá se k teplému roztoku agaru. Postupně se přidají pankreatický kaseinový hydrolyzát, kvasničný výtažek, glukosa a chlorid sodný a po jejich rozpuštění za tepla se přidá thioglykolan sodný nebo kyselina thioglykolová a případně se ještě přidá roztok hydroxidu sodného 1 mol/l na úpravu pH. Je-li zapotřebí filtrace, zahřeje se roztok téměř až k varu a za tepla se filtruje navlhčeným filtračním papírem. Potom se přidá roztok sodné soli resazurinu, promíchá se a rozplní do vhodných nádob, které zajistí, že se do konce inkubační doby nezmění pohlcováním kyslíku barevně více než horní třetina půdy. Sterilizuje se 20 min v autoklávu při 120 °C. Je-li to nutné, regeneruje se půda právě před použitím tak, že se 20 min zahřívá ve vodní lázni a potom se rychle ochladí.

Půda z hydrolyzátů sóji a kaseinu

pankreatický hydrolyzát kaseinu	17,0 g
papainový hydrolyzát sóji	3,0 g
chlorid sodný	5,0 g
hydrogenfosorečnan draselný	2,5 g
glukosa monohydrát	2,5 g
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 7,3 ± 0,2.

Pevné látky se za mírného zahřátí rozpustí ve vodě a roztok se ochladí na pokojovou teplotu. V případě potřeby se přidá roztok hydroxidu sodného 1 mol/l na úpravu pH. Je-li to nutné, filtruje se do vyjasnění, potom se rozplní do vhodných nádob a sterilizuje se 20 min v autoklávu při 120 °C.

2.6.2 Mycobacterium tuberculosis

Podstata zkoušky. Nepřítomnost mikroba *Mycobacterium tuberculosis* se zjišťuje kultivací ve vhodných živných půdách a naočkováním přípravku vnímavým laboratorním zvířatům.

Postup zkoušky

a) *Kultivační metoda.* Do nejméně deseti zkumavek obsahujících po 25 ml vhodné tekuté živné půdy a do nejméně deseti zkumavek obsahujících vhodnou pevnou živnou půdu se naočkuje po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Inkubuje se 42 dní při teplotě 37 °C. Růstové vlastnosti živných půd v přítomnosti zkoušeného přípravku se ověří naočkováním vhodného kmene *Mycobacterium tuberculosis*, jako je např. H 37 RA nebo BCG, a je-li třeba, použije se vhodná neutralizační látka. Jestliže v prvních osmi dnech inkubace vyrostou kolonie kontaminujících mikroorganismů, zkouška se opakuje a současně se provede bakteriologická zkouška sterility. Přípravek nevyhovuje, jestliže se na konci inkubační doby zjistí nárůst mykobakterií v některé zkumavce.

b) *Naočkování a zkouška laboratorních zvířat.* Pěti morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, jež byla v tuberkulinové zkoušce (ověří se intradermálním podáním 100 m.j. tuberkulinu) negativní, se intraperitoneálně vstříkne po 1 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 60 dní. Jestliže přežije méně než dvě zvířata, zkouška se opakuje. Zvířata, která přežila, se usmrtí a při pitvě se ani u jednoho z pěti morčat nenajdou tuberkulózní změny.

2.6.3 Důkaz cizích virů zkouškou na kuřecích embryích

Podstata zkoušky. Přítomnost cizích virů se zjišťuje naočkováním zkoušeného přípravku do alantoidního vaku a na chorioalantoidní membránu kuřecích embryí a sledováním, zda zkoušená očkovací látka nevyvolá jejich úhyn nebo vznik změn.

Postup zkoušky. Ke zkoušce se použije tekutá nebo lyofilizovaná očkovací látka, jež byla rozpuštěna v tekutině uvedené na štítku nebo v jiné vhodné tekutině vždy s přísadou antibiotik. Předpisuje-li to článek, neutralizuje se očkovací látka monospecifickým antisérem. V případě potřeby se očkovací látka ředí tak, aby deset očkovacích dávek bylo obsaženo v 0,2 ml. Směs se naočkuje devíti až jedenácti denním kuřecím embryím z chovu bez specifikovaných patogenů. Embrya se rozdělí do dvou skupin po deseti:

- 0,2 ml se vstříkne do alantoidního vaku každého vejce z první skupiny,
- 0,2 ml se vstříkne na chorioalantoidní membránu každého vejce z druhé skupiny.

Vejce se po dobu 7 dní denně prosvěcují. Embrya, která uhynula v průběhu prvních 24 h, se vyřadí jako nespecifické úhyny; jestliže v každé skupině nepřežije prvních 24 h po naočkování alespoň šest embryí, je zkouška neplatná. U všech embryí, která uhynou po více než 24 h od naočkování, nebo u těch, která přežijí 7 dní, se hledají změny. Zároveň se hledají změny v chorioalantoidních membránách. Alantoidní tekutiny se zkoušejí na přítomnost hemaglutinačních látek a v buňkách získaných odstředěním alantoidní tekutiny se pomocí fluorescenční protilátky zjišťuje přítomnost viru infekční bronchitidy. Mimoto se provede další pasáž na kuřecích embryích.

Materiál z živých a mrtvých embryí se odděleně shromáždí a každá z takto získaných směsí se vstříkne výše uvedeným postupem do deseti vajec pro oba výše popsané způsoby podání. Směsi z chorioalantoidní membrány se vstříknou na tuto membránu, alantoidní tekutiny do alantoidních vaků. Vejce se pozorují 7 dní a zkoušejí stejným způsobem, jak je uvedeno výše.

Očkovací látka nevyhovuje, jestliže dojde k jakémukoliv úhynu nebo vzniku změn, jež by mohla způsobit očkovací látka.

2.6.4 Zkouška na viry leukózy

Podstata zkoušky. Přítomnost virů leukózy se zjišťuje metodou komplement-fixační reakce po pomnožení v buněčné kultuře kuřecích fibroblastů.

Postup zkoušky. Je-li to předepsáno v článku, neutralizuje se očkovací látka monospecifickým antisérem. Na buněčné kultury kuřecích embryonálních fibroblastů, o kterých je známo, že podporují pomnožování virů leukózy podskupin A a B, se naočkuje očkovací látka v množství 10 dávek na jednu kulturu. Kultur má být alespoň pět a každá má mít plochu alespoň 60 cm^2. Fibroblasty se pasážují v tří- až čtyřdenních intervalech a udržují se alespoň 9 dní. Na konci poslední pasáže se buňky oddělí, resuspendují se na koncentraci 10^7 buněk v ml a připraví se extrakt. Každý extrakt se komplement-fixační reakcí přezkouší na přítomnost skupinově specifického antigenu ptačí leukózy. Na kontrolní buněčné kultury se naočkují viry leukózy podskupin A a B a zkoušejí se souběžně. Očkovací látka nevyhovuje, jestliže se zjistí jakákoliv známka přítomnosti viru leukózy. Nejsou-li výsledky jednoznačné, provedou se další pasáže fibroblastů a zkouší se až do dosažení jednoznačného výsledku.

2.6.5 Důkaz cizích virů zkouškou na buněčných kulturách

Podstata zkoušky. Přítomnost cizích virů se zjišťuje naočkováním zkoušeného přípravku do buněčné kultury a sledováním, zda nedojde ke vzniku cytopatického efektu nebo ke vzniku hemadsorpce.

Postup zkoušky. Ke zkoušce se použije tekutá nebo lyofilizovaná očkovací látka, jež byla rozpuštěna tekutinou uvedenou na štítku nebo jinou vhodnou tekutinou. Předepisuje-li to článek, neutralizuje se očkovací látka monospecifickým antisérem. V případě potřeby se očkovací látka zředí tak, aby 10 očkovacích dávek bylo obsaženo v 0,1 ml. Naočkuje se po 0,5 ml směsi na kultury ledvinných buněk odvozených z kuřat, která pocházejí z chovu bez specifikovaných patogenů, nebo na kultury jaterních buněk z embryí, která pocházejí z chovu bez specifikovaných patogenů, a nechá se 1 h adsorpovat při teplotě 37 °C. Kultur by mělo být alespoň pět a měly by mít celkovou plochu asi 150 cm^2. V kulturách se nejméně pět dní hledají cytopatické efekty, jejichž příčinou může být očkovací látka. Jestliže se nepozorují žádné specifické efekty, provedou se další pasáže směsí buněk a tekutin odebraných ze všech kultur v intervalech nejméně pětidenních a pozorují se v průběhu dvacetidenního inkubačního období. Zkoušejí se rovněž poslední pasáže kultur na přítomnost původců hemadsorpce, k čemuž se použijí kuřecí erytrocyty. Původci hemadsorpce jsou mikroorganismy nebo viry, které způsobují adsorpci erytrocytů na povrch buněčných kultur, v nichž se pomnožili. Hemadsorpce se zjišťuje tímto způsobem: Na konci období zkoušek se z jednovrstvé buněčné kultury slije tkáňové médium a kultura se promyje. Pak se přidá 0,5% suspenze promytých erytrocytů. Nechá se adsorpovat 20 min při teplotě 4 °C. Buňky se promyjí *tlumivým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným o pH 7,4* a pozorují se pod mikroskopem. Došlo-li k hemadsorpci, jsou vidět shluky erytrocytů přichycených na jednovrstvou buněčnou kulturu. Jestliže po každé pasáži nepřežije alespoň 80 % kultur, je zkouška neplatná. Vakcína nevyhovuje zkoušce, jestliže se zjistí jakýkoliv cytopatický efekt nebo přítomnost původců hemadsorpce.

2.6.6 Důkaz cizích antigenů zkouškou na kuřatech

Podstata zkoušky. V séru naočkovaných kuřat se sérologickými metodami zjišťuje přítomnost protilátek proti cizím antigenům.

Postup zkoušky. Pokud není v článku předepsáno jinak, provede se zkouška nejméně na deseti dvoutýdenních kuřatech pocházejících z chovu bez specifikovaných patogenů. Každému kuřeti se intramuskulárně vstříkne 100 dávek a do oka se nakape 10 dávek. Za dva týdny se očkování opakuje. Kuřata se pozorují pět týdnů od prvního očkování. V období sledování se kuřatům nepodávají žádné protimikrobní látky.

Od všech kuřat se před prvním očkováním a na konci zkušebního období odebere sérum. Každý vzorek séra se vhodnou metodou vyzkouší na protilátky proti původcům níže uvedených infekcí s výjimkou protilátek proti původci, z něhož byla vakcína připravena. Vakcína nevyhovuje zkoušce, jestliže se dokáže přítomnost cizího antigenu. Zkouška je neplatná a opakuje se, když byla v sérech před očkováním prokázána nějaká protilátka. Jestliže do konce zkoušky přežije méně než 80 % zvířat, je zkouška rovněž neplatná. Se souhlasem národní autority se mohou použít jiné druhy zkoušek, pokud jsou alespoň tak citlivé, jako uvedené zkoušky a přiměřeně specifické.

Infekce	*Druh zkoušky*
infekční bronchitida[1)]	precipitace v agarovém gelu nebo inhibice hemaglutinace
infekce burzy (choroba Gumboro)	precipitace v agarovém gelu
Markova choroba	precipitace v agarovém gelu
Newcastleská choroba	inhibice hemaglutinace
infekce Salmonella pullorum	aglutinace
infekce adenoviry[2)]	precipitace v agarovém gelu
infekce virem ptačí encefalomyelitidy	precipitace v agarovém gelu nebo enzymově imunosorbentové stanovení (ELISA)
infekce reoviry[2)]	precipitace v agarovém gelu
infekce viry leukózy[2)]	sérová neutralizace
influenza A[2)]	precipitace v agarovém gelu
infekční laryngotracheitida[2)]	sérová neutralizace

2.6.7 Zkouška na mykoplazmata

Podstata zkoušky. Kultivací na pevných a v tekutých půdách se zjišťuje přítomnost mykoplazmat.

Zkouška používaná pro aviární vakcíny

Živné půdy. Ke kultivaci většiny známých druhů mykoplazmat se používají pevné a tekuté živné půdy popsané níže. Vybrané půdy se vyzkouší alespoň, zda umožňují růst *Mycoplasma gallisepticum* (půda I) a *Mycoplasma synoviae* (půda II). Ke zkoušení půd se doporučuje použít kmeny, které prošly omezeným počtem pasáží.

Inhibující látky. Zkouška se provede s přidáním i bez přidání zkoušeného přípravku. Je-li třeba, neutralizují se inhibující látky obsažené ve zkoušené vakcíně a opakováním zkoušky se ověří účinnost neutralizačního postupu.

Postup zkoušky

Tekuté půdy. Použijí se alespoň dvě tekuté živné půdy, které jsou vhodné pro kultivaci mykoplazmat (viz níže). Pro každou půdu se rozpustí obsah pěti nádobek lyofilizované očkovací látky (nebo nejvýše 5000 očkovacích dávek) v 12 ml tekutiny uvedené na štítku nebo jiné vhodné tekutiny. U tekutých očkovacích látek se použije odpovídající množství. Do 100 ml půdy se naočkuje 10 ml rozpuštěné očkovací látky. Dojde-li po přidání očkovací látky k nějakým významným změnám pH půdy, upraví se pH na původní hodnotu přidáním roztoku hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. Inkubuje se tři týdny při teplotě (37 ± 1) °C a denně se prohlíží. Třetí, sedmý a čtrnáctý den od začátku inkubace se vyočkuje po 0,2 ml na agarovou půdu (miska o průměru 90 mm obsahující 18 ml půdy). Pokud se v tekuté půdě zjistí nějaká barevná změna, vyočkuje se bezprostředně. Jestliže se v tekuté půdě projeví kontaminace bakteriemi nebo houbami, zkouška se opakuje.

---

1) Se souhlasem oprávněné autority se tato rutinní šaržová zkouška může vypustit, pokud se v každé šarži provádí důkaz cizích virů zkouškou na kuřecích embryích (*2.6.3*).

2) Pokud není v článku uvedeno jinak, lze se souhlasem oprávněné autority upustit od rutinního provádění zkoušek na tyto viry u každé šarže.

Pro každé očkování se použijí čtyři misky, z nichž dvě se inkubují při teplotě (37 ± 1) °C za aerobních podmínek v atmosféře vzduchu s vysokou relativní vlhkostí a obsahem 5 % až 10 % oxidu uhličitého a další dvě se inkubují za anaerobních podmínek v dusíkové atmosféře s vysokou relativní vlhkostí a obsahem 5 % až 10 % oxidu uhličitého. Misky se 3 týdny pravidelně prohlížejí stereomikroskopem a v případě potřeby se barví vhodným barvivem. Když na agarové půdě vyroste kolonie, provede se identifikace.

Pevné půdy. Použijí se alespoň dvě pevné živné půdy, které jsou vhodné na kultivaci mykoplazmat (viz níže). Na šest misek od každé půdy se naočkuje po 0,2 ml směsi očkovací látky popsané ve zkoušce v tekutých živných půdách. Misky se inkubují a prohlížejí tak, jak je uvedeno výše.

Hodnocení. Vakcína vyhovuje, jestliže nebyla prokázána kontaminace mykoplazmaty.

Zkouška na neaviární mykoplazmata a ureaplazmata

Živné půdy. Použijí se živné půdy vybrané pro podporu pomnožování širokého rozsahu mykoplazmat. U každé šarže se prokáže, že podporuje pomnožování *Mycoplasma hyopneumoniae* a *Ureaplasma urealyticum.* Ke zkoušení půd se doporučuje použít kmeny, které prošly omezeným počtem pasáží. Zkouška se provede s tekutými a pevnými živnými půdami, jež byly vybrány tak, aby společně poskytovaly nejlepší podmínky k pomnožení všech možných kontaminant. Tekuté půdy obsahují fenolovou červeň.

Inhibující látky. Zkouška se provede s přidáním i bez přidání zkoušeného přípravku. Je-li třeba, neutralizují se inhibující látky obsažené ve zkoušeném přípravku a opakováním zkoušky se ověří účinnost neutralizačního postupu.

Vzorkování. Doporučený počet zkoušených nádobek (viz též *2.6.1*) je 1 % z množství v šarži, nejméně však 4 a nejvýše 10. Obsah nádobek se po případné rekonstituci smíchá.

Postup zkoušky

Tekuté půdy. 50 ml každé půdy se zvlášť naočkuje 5 ml zkoušeného přípravku. Dojde-li po přidání přípravku k nějakým významným změnám pH půdy, upraví se pH na původní hodnotu přidáním roztoku hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. Inkubuje se tři týdny při teplotě (36 ± 1) °C a třikrát týdně se prohlíží. Třetí, sedmý a čtrnáctý den se vyočkuje po 0,2 ml na agarovou půdu v misce o průměru 60 mm. Pokud se v tekuté půdě zjistí nějaká barevná změna, vyočkuje se bezprostředně. Jestliže se v tekuté půdě projeví kontaminace bakteriemi nebo houbami, zkouška se opakuje. Pro každé vyočkování se použijí čtyři misky, z nichž dvě se inkubují při teplotě (36 ± 1) °C za aerobních podmínek v atmosféře vzduchu s vysokou relativní vlhkostí a obsahem 5 % až 10 % oxidu uhličitého a další dvě se inkubují za anaerobních podmínek v dusíkové atmosféře s vysokou relativní vlhkostí a obsahem 5 % až 10 % oxidu uhličitého. Misky se tři týdny pravidelně prohlížejí stereomikroskopem a v případě potřeby se barví vhodným barvivem.

Pevné půdy. Na čtyři misky (o průměru 60 mm) od každé půdy se naočkuje po 0,2 ml zkoušeného přípravku. Misky se inkubují a prohlížejí tak, jak je uvedeno výše. Kdyby po sedmi dnech od naočkování byla nejvýše jedna miska v každé části zkoušky náhodně kontaminována bakteriemi nebo houbami či poškozena, může se tato miska vyloučit z odčítání za předpokladu, že nevykazuje růst mykoplazmat. Jestliže by v jakékoliv části zkoušky bylo náhodně kontaminováno bakteriemi nebo houbami či poškozeno více než jedna miska, je zkouška neplatná a opakuje se.

Hodnocení. Přípravek vyhovuje, jestliže nebyla prokázána kontaminace mykoplazmaty nebo ureaplazmaty.

Následující oddíl se uvádí jako informace a rada; netvoří část, jež by byla v rozporu s obecnou metodou.

Doporučené živné půdy

Následující půdy se doporučují. Jiné půdy mohou být použity za předpokladu, že se u každé šarže prokáže schopnost podporovat růst mykoplazmat v přítomnosti i nepřítomnosti zkoušené vakcíny.

I. Půdy doporučené pro důkaz Mycoplasma gallisepticum

a) Tekutá půda

infuze z hovězího srdce (1)	90,0 ml
koňské sérum (nezahřáté)	20,0 ml
roztok kvasničného výtažku (250 g/l)	10,0 ml
roztok octanu thallného (10 g/l)	1,0 ml
roztok červeně fenolové (0,6 g/l)	5,0 ml
roztok penicilinu (20 000 m.j./ml)	0,25 ml
roztok kyseliny deoxyribonukleové (2 g/l)	1,20 ml

pH se upraví na 7,8.

b) Pevná půda

Připraví se stejně jako tekutá půda s tím rozdílem, že infuze z hovězího srdce obsahuje v litru 15 g agaru.

II. Půdy doporučené pro důkaz Mycoplasma synoviae

a) Tekutá půda

infuze z hovězího srdce (1)	90,0 ml
esenciální vitaminy (2)	0,025 ml
roztok glukosy monohydrátu (500 g/l)	2,0 ml
prasečí sérum (inaktivované při 56 °C, 30 min)	12,0 ml
roztok ß-nikotinamid-adeninu dinukleotidu (10 g/l)	1,0 ml
roztok cysteiniumchloridu (10 g/l)	1,0 ml
roztok červeně fenolové (0,6 g/l)	5,0 ml
roztok penicilinu (20 000 m.j./ml)	0,25 ml

Smíchají se roztoky ß-nikotinamid-adeninu dinukleotidu a cysteiniumchloridu a za 10 min se přidají k ostatním složkám. Hodnota pH se upraví na 7,8.

b) Pevná půda

infuze z hovězího srdce (1)	90,0 ml
ionagar (3)	1,4 g

Hodnota pH se upraví tak, aby bylo 7,8; sterilizuje se v autoklávu a pak se přidají:

esenciální vitaminy (2)	0,025 ml
roztok glukosy monohydrátu (500 g/l)	2,0 ml
prasečí sérum (nezahřáté)	12,0 ml
roztok ß-nicotinamid-adeninu dinukleotidu (10 g/l)	1,0 ml
roztok cysteiniumchloridu (10 g/l)	1,0 ml
roztok červeně fenolové (0,6 g/l)	5,0 ml
roztok penicilinu (20 000 m.j./ml)	0,25 ml

(1) Infuze z hovězího srdce

hovězí srdce (pro přípravu infuze)	500,0 g
pepton	10,0 g
chlorid sodný	5,0 g
destilovaná voda do	1000,0 ml

Sterilizuje se v autoklávu.

(2) Esenciální vitaminy

biotin	100,0 mg
pantotenan vápenatý	100,0 mg
choliniumchlorid	100,0 mg
kyselina listová	100,0 mg
inositol	200,0 mg
nikotinamid	100,0 mg
pyridoxoliumchlorid	100,0 mg
riboflavin	10,0 mg
thiaminiumchlorid	100,0 mg
destilovaná voda do	1000,0 ml

(3) Ionagar

Velmi čistý agar používaný pro mikrobiologii a imunologii, připravený výměnou iontů, čímž vzniká produkt mající vyšší čistotu, čirost a pevnost gelu. Obsahuje přibližně:

voda	12,2 %
popel	1,5 %
popel nerozpustný v kyselině	0,2 %
chloridy	0
fosforečnany (jako P_2O_5)	0,3 %
celkový dusík	0,3 %
měď	8 μg/g
železo	170 μg/g
vápník	0,28 %
hořčík	0,32 %

2.6.8 Zkouška na pyrogenní látky

Podstata zkoušky. Pyrogenní látky obsažené ve sterilním injekčním roztoku vyvolají u králíka po nitrožilním podání vzestup jeho rektální teploty.

Výběr zvířat. Ke zkoušce se použijí zdraví dospělí králíci[3)] o hmotnosti nejméně 1,5 kg. Zvířata jsou chována v klidném prostředí v individuálních klecích, krmena standardní vyváženou dietou bez obsahu antibiotik a jejich hmotnost nevykazuje během týdne před zkouškou žádný úbytek. Teplota chovné místnosti je stálá a neliší se o více než 3 °C od teploty zkušební místnosti. U všech králíků, používaných k těmto zkouškám, se vedou záznamy o jejich hmotnosti, podaných přípravcích a teplotních křivkách. Po zkoušce s nepyrogenním výsledkem se může králík vzít do nové zkoušky nejdříve za 3 dny, po zkoušce s pyrogenním přípravkem se tento interval prodlužuje na 3 týdny.

[3)] Doporučuje se používat samců vhodného jednotného plemene o hmotnosti 2,0 kg až 3,8 kg.

Přístrojové vybavení. Pohyblivost králíka při zkoušce se omezuje vhodným zařízením, které fixuje netraumatizujícím způsobem pouze šíji zvířete a dovolí mu zaujmout normální uvolněnou pozici v sedě. K měření tělesné teploty se použijí rektální teploměry nebo elektrické termometry, které udávají teplotu s přesností 0,1 °C. Po lehkém potření nedráždivou vazelínou jsou zavedeny do konečníku za vnitřní sfinkter, tj. přibližně do hloubky 5 cm. Tato hloubka zavedení teploměru musí být u každého králíka během celé zkoušky konstantní.

Nádoby, injekční stříkačky a jehly, které přicházejí do styku se zkoušeným roztokem, se pečlivě vymyjí vodou pro injekci a sterilizují v horkovzdušném sterilizátoru 30 min při 250 °C nebo 1 h při 200 °C.

Předběžné otestování králíků. U každého králíka, vybraného pro zkoušku na pyrogen, je třeba otestovat jeho citlivost na nepyrogenní roztok chloridu sodného (9 g/l), zahřátý na 38,5 °C a podaný nitrožilně v dávce 10 ml/kg tělesné hmotnosti. Rektální teplota měřená průběžně od 90 min před injekcí do 3 h po injekci nevykazuje změnu vyšší než 0,6 °C, jinak se zvíře nepoužije k vlastní zkoušce. Tento test citlivosti se též provede u všech králíků, kteří mají být po zkoušce s pyrogenním výsledkem znovu vzati do pokusů.

Provedení zkoušky. Zkouška se provádí v oddělené nerušené místnosti se stálou teplotou kolem 20 °C. Ke zkoušce se použijí tři králíci, kterým je večer předtím odebrána potrava. Po upoutání do fixačního zařízení a zavedení rektálních termometrů se u každého zvířete 90 min sleduje tělesná teplota v 30min intervalech. Za "výchozí teplotu" králíka je považován průměr ze dvou odečtů, naměřených v posledních 40 min před podáním zkoušeného roztoku. "Maximální teplotou" se rozumí nejvyšší teplota naměřená v 30min intervalech v průběhu 3 h po podání zkoušeného roztoku. Reakce králíka je vyjádřena rozdílem mezi jeho výchozí a maximální naměřenou teplotou. Jestliže je tento rozdíl negativní, je výsledek počítán jako nulová odpověď. Ze zkoušky se vyřadí králík, u kterého se při stanovení "výchozí teploty" liší naměřené dvě hodnoty o více než 0,2 °C nebo "výchozí teplota" je vyšší než 39,8 °C nebo nižší než 38,0 °C. U jednotlivých zvířat ve skupině se jejich "výchozí teploty" mezi sebou neliší o více než 1 °C.

Zkoušený roztok, zahřátý na teplotu asi 38,5 °C, se pomalu vstříkne do marginální ušní žíly králíka s dobou podání nejvýše 4 min, není-li v příslušném článku uvedeno jinak. Zkoušená látka se může rozpustit nebo zředit nepyrogenním roztokem chloridu sodného (9 g/l) nebo jiným předepsaným ředidlem. Množství látky pro provedení zkoušky se liší podle zkoušeného přípravku a je předepsáno v příslušném článku. Objem vstřikovaného roztoku má být nejméně 0,5 ml/kg a nejvýše 10 ml/kg tělesné hmotnosti.

Zhodnocení výsledků. Výsledek zkoušky se posoudí na základě naměřených vzestupů rektální teploty u použité skupiny králíků podle tabulky 2.6.8-1.

Jestliže součet reakcí (tj. vzestupů rektální teploty u jednotlivých králíků ve skupině) je vyšší než hodnoty uvedené v druhé kolonce, ale menší než limity uvedené ve třetí kolonce, zkouška se opakuje na další trojici králíků až do celkového a konečného počtu dvanácti zvířat.

Králíci, u nichž vzestup rektální teploty ve zkoušce na pyrogen přestoupí 1,2 °C,se trvale vyřadí.

Tab. 2.6.8-1

Počet králíků	Přípravek vyhovuje, není-li součet reakcí vyšší než	Přípravek nevyhovuje, je-li součet reakcí vyšší než
3	1,15 °C	2,65 °C
6	2,80 °C	4,30 °C
9	4,45 °C	5,95 °C
12	6,60 °C	6,60 °C

2.6.9 Zkouška na neškodnost

Všeobecná zkouška

Zkouška se provede na skupině pěti zdravých myší, vážících 17 g až 22 g. Množství zkoušené látky, předepsané v příslušném článku, se rozpustí v 0,5 ml *vody na injekci R* nebo sterilního roztoku chloridu sodného (9 g/l) a vstříkne se myším do ocasní žíly během 15 s až 30 s, není-li předepsáno jinak.

Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže žádná myš neuhyne během 24 h nebo během doby, která je předepsána v příslušném článku. Uhyne-li více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje. Při úhynu jednoho zvířete ze skupiny se zkouška opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže z druhé skupiny neuhyne během určené doby pozorování žádná myš.

Imunní séra a vakcíny pro humánní použití

Pokud není předepsáno jinak, vstříkne se intraperitoneálně pěti zdravým myším, vážícím 17 g až 22 g, po jedné lidské dávce, nejvýše však po 1,0 ml zkoušeného přípravku. Lidskou dávkou se rozumí dávka uvedená v označení zkoušeného přípravku nebo v jeho příbalovém letáku. Zvířata se pozorují 7 dní. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá příznaky onemocnění. Uhyne-li více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje. Při úhynu nebo příznacích onemocnění jednoho zvířete se zkouška opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže během určené doby pozorování z druhé skupiny žádné zvíře neuhyne ani nemá žádné příznaky onemocnění.

Zkouška se také provede na dvou zdravých morčatech vážících 250 g až 350 g. Každému zvířeti se intraperitoneálně vstříkne jedna lidská dávka, nejvýše však 5,0 ml zkoušeného přípravku. Lidskou dávkou se rozumí dávka uvedená v označení zkoušeného přípravku nebo v jeho příbalovém letáku. Zvířata se pozorují 7 dní. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže žádné zvíře nemá příznaky onemocnění. Uhyne-li více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje. Při úhynu nebo příznacích onemocnění jednoho zvířete se zkouška opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže během určené doby pozorování z druhé skupiny žádné zvíře neuhyne ani nemá žádné příznaky onemocnění.

Imunní séra a vakcíny pro veterinární použití

Pokud není předepsáno jinak, vstříkne se podkožně pěti zdravým myším, vážícím 17 g až 22 g, po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 7 dní. Přípravek vyhovuje, jestliže žádné zvíře nemá významné místní nebo systémové reakce. Uhyne-li více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje. Uhyne-li jedno zvíře nebo má významné místní nebo systémové reakce, zkouška se opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže během určené doby pozorování žádné zvíře z druhé skupiny neuhyne ani nemá významné místní ani systémové reakce.

Zkouška se také provede na dvou zdravých morčatech vážících 250 g až 350 g. Každému zvířeti se intraperitoneálně vstříknou nejméně 2 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 7 dní.

Přípravek vyhovuje, jestliže žádné zvíře nemá významné místní nebo systémové reakce. Uhyne-li více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje. Uhyne-li jedno zvíře nebo má významné místní nebo systémové reakce, zkouška se opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže během určené doby pozorování žádné zvíře z druhé skupiny neuhyne ani nemá významné místní ani systémové reakce.

2.6.10 Zkouška na přítomnost histaminu

Podstata zkoušky. Přítomnost znečištěnin typu histaminu ve zkoušeném přípravku vyvolá na izolovaném tenkém střevě morčete kontrakce, které se porovnávají s účinkem standardu (histaminiumdichloridu).

Příprava zvířete. Ke zkoušce se použije zdravé morče o hmotnosti 250 g až 350 g, které bylo předchozích 24 h ponecháno bez krmiva. Po usmrcení vykrvácením se odejme distální část tenkého střeva v délce 2 cm a vymyje se šetrně pomocí stříkačky roztokem B, zahřátým na teplotu 34 °C až 36 °C. Na oba konce střevního segmentu se připevní tenká nit, kterou se prošije střevní stěna tak, aby střevo zůstalo průchodné. Jeden konec střeva se touto nití připevní ke skleněnému nosiči a vloží se na dno orgánové lázně o objemu 10 ml až 20 ml naplněné roztokem B, který je udržován na stálé teplotě 34 °C až 36 °C a probublává se směsí 95 % (*V/V*) kyslíku a 5 % (*V/V*) oxidu uhličitého. Druhý konec střeva se napojí na izotonický snímač kontrakcí, které se registrují pomocí kymografu nebo jiným vhodným kontinuálním zapisovačem při zvětšení přibližně dvacetinásobném. Napnutí střeva má být asi 9,8 mN (1 g) a mělo by být upraveno podle citlivosti orgánu.

Příprava roztoků.

Roztok A:	chlorid sodný	160,0 g
	chlorid draselný	4,0 g
	chlorid vápenatý bezvodý	2,0 g
	chlorid hořečnatý bezvodý	1,0 g
	hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	0,10 g
	voda na injekci	do 1000,0 ml
Roztok B:	roztok A	50,0 ml
	atropiniumsulfat	0,0005 g
	hydrogenuhličitan sodný	1,0 g
	glukosa monohydrát	0,5 g
	voda na injekci	do 1000,0 ml

Roztok B se má připravovat vždy čerstvý pro spotřebu do 24 h.

Porovnávací roztok. Jako porovnávací roztok se používá roztok *histaminiumdichloridu R* o doporučené koncentraci 0,1 mg/ml. Připraví se vždy čerstvý.

Provedení zkoušky. Orgánová lázeň se vypláchne roztokem B a nechá se 10 min stabilizovat. Po následném dvoj- až trojnásobném propláchnutí roztokem B se vyvolají stahy střeva přidáváním roztoku *histaminiumdichloridu R* v objemech mezi 0,2 ml až 0,5 ml, aby se zjistila dávka, která způsobí reprodukovatelnou submaximální kontrakci. Tato dávka se nazývá "dávka vysoká". Před každým přidáním histaminu se lázeň třikrát propláchne roztokem B (kontinuálním průtokem bez vyprázdnění lázně). Dávky se aplikují v pravidelných intervalech umožňujících úplnou relaxaci střevního segmentu (asi 2 min).

Po zjištění "vysoké dávky" se určuje dávka zvaná "nízká" tím, že se do lázně přidává roztok *histaminiumdichloridu R* ve větším zředění (ale ve stejných objemech) tak, aby se dosáhla reprodukovatelná kontrakce střevního segmentu přibližně poloviční ve srovnání s dávkou "vysokou".

V dalším postupu se pravidelně střídá podávání "vysoké" a "nízké" dávky roztoku histaminu s podáním zkoušené látky, jejíž koncentrace se upravuje tak, aby vyvolaná kontrakce střeva (pokud je vůbec pozorovatelná) byla menší než stah po "vysoké dávce" histaminu. Kontrakce střeva po zkoušené látce mají být reprodukovatelné a velikost stahů po "vysoké" i "nízké" dávce histaminu má v průběhu sledování zůstat nezměněna.

Zhodnocení výsledků. Ze srovnání velikosti kontrakce střeva po podání zkoušené látky s kontrakcemi dosaženými po "vysoké" a "nízké" dávce histaminu se provede odhad obsahu histaminové účinnosti ve zkoušené látce, vyjádřený v mikrogramech báze histaminu. Tato hodnota nemá přesáhnout limit uvedený v lékopisném článku.

Jestliže zkoušený roztok nevyvolá žádný stah střeva, připraví se čerstvý roztok zkoušené látky s přidaným histaminem v množství, které představuje povolené maximum pro zkoušenou látku podle lékopisného článku, a pozoruje se, zda po přidání do lázně odpovídá kontrakce střeva přidanému histaminu. Jestliže tomu tak není nebo není-li kontrakce, vyvolaná zkoušeným roztokem reprodukovatelná nebo jsou-li následné odpovědi na "vysokou" a "nízkou" dávku histaminu sníženy, výsledky zkoušky nejsou hodnotitelné a provede se Zkouška na hypotenzivní látky (*2.6.11*).

2.6.11 Zkouška na hypotenzivní látky

Podstata zkoušky. Nežádoucí příměs látek snižujících krevní tlak ve zkoušeném přípravku se zjišťuje na krevním tlaku anestezované kočky v porovnání s účinkem histaminu.

Příprava zvířete. Ke zkoušce se použije zdravá kočka o hmotnosti nad 2 kg, která se uvede do celkové anestezie pomocí chloralosy nebo barbiturátu tak, aby se zajistilo udržování stálého krevního tlaku.[4)]

Zvíře se upevní na operačním stole v poloze na zádech a dbá se na to, aby tělesná teplota, měřená rektálním teploměrem, neklesla pod fyziologickou hodnotu. Do průdušnice se zavede dýchací kanyla. Druhá kanyla, naplněná heparinizovaným roztokem chloridu sodného (9 g/l), se zavede do arteria carotis communis a spojí se s vhodným snímačem krevního tlaku a s registračním zařízením, umožňujícím kontinuální záznam. Pro nitrožilní podávání zkoušeného přípravku a referenční látky se zavede do vena femoralis třetí kanyla, naplněná též heparinizovaným roztokem chloridu sodného (9 g/l). Po deseti- až patnáctiminutové stabilizaci krevního tlaku se přistoupí k vlastní zkoušce.

Příprava roztoků. Zkoušená látka se rozpustí v roztoku chloridu sodného (9 g/l) nebo v jiném předepsaném rozpouštědle na koncentraci předepsanou v příslušném článku.

Referenční látkou je *histaminiumdichlorid R*, který se rozpustí v roztoku chloridu sodného (9 g/l) na koncentraci odpovídající 0,1 μg histaminové báze v 1 ml (roztok histaminu).

Provedení zkoušky. Nejdříve je třeba ověřit citlivost zvířete na histamin tím, že se mu vstřikuje v pravidelných intervalech roztok histaminu v dávkách, odpovídajících 0,1 μg a 0,15 μg histaminové báze (tj. 1,0 ml a 1,5 ml *roztoku histaminu RS*) na kilogram tělesné hmotnosti. Každá následující dávka se vstříkne nejdříve za 1 min po navrácení krevního tlaku k normě. Kočka se použije ke zkoušce pouze tehdy, jestliže po nižší dávce histaminu dojde ke zřetelnému a konstantnímu poklesu krevního tlaku a jestliže vyšší dávka histaminu vyvolá vyšší odpověď.

Při vlastní zkoušce se zvířeti vstříkne 1 ml roztoku histaminu na kilogram, pak dvakrát roztok zkoušeného přípravku v objemu a koncentraci předepsané v příslušném článku a nakonec opět 1 ml roztoku histaminu na kilogram. Tato čtveřice dávek se dvakrát opakuje a celá zkouška se zakončí podáním 1,5 ml *roztoku histaminu RS* na kilogram. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže pokles krevního tlaku na vyšší dávku histaminu (1,5 ml/kg) je větší než na dávku nižší (1,0 ml/kg).

[4)] Jako vhodné celkové anestetikum se doporučuje roztok 0,6 g sodné soli fenobarbitalu a 0,4 g chloralosy ve 100 ml roztoku chloridu sodného (9 g/l), který se podá intraperitoneálně v dávce 8,0 ml/kg.

Zhodnocení výsledků. Zkoušený přípravek nevyhovuje:

a) jestliže průměrná hodnota ze série odpovědí na zkoušený přípravek je větší než průměr odpovědí na 1,0 ml roztoku histaminu na kilogram, nebo
b) jestliže některá z dávek zkoušeného přípravku vyvolá větší pokles krevního tlaku než závěrečná dávka roztoku histaminu (1,5 ml/kg).

Kočka se nemůže použít ke zkoušení jiného přípravku na obsah hypotenzivních látek, jestliže platí kritérium b) nebo jestliže odpověď na konečnou vyšší dávku histaminu je menší než průměr odpovědí na předchozí nižší dávky histaminu.

2.6.12 Zkouška mikrobiálního znečištění nesterilních výrobků (celkový počet živých aerobů)

Celkový počet živých aerobů se stanoví metodou membránové filtrace, počítáním na agarových půdách nebo za pomoci řady ředění podle předpisu.

Stanovení se provádí za podmínek vylučujících nahodilé znečištění. Opatření k vyloučení znečištění nepůsobí na prokazované mikroorganismy.

Pokud není předepsáno jinak, používá se 10 g nebo 10 ml zkoušené látky, odebrané za výše uvedených podmínek. K získání požadovaného množství se smíchá více vzorků látky náhodně odebraných nebo obsah dostatečného množství nádob. Podle povahy zkoušené látky se ředí, rozpouští, suspenduje nebo emulguje za použití vhodné tekutiny.

Pokud má látka protimikrobní vlastnosti, odstraní se tyto zředěním, neutralizací nebo filtrací.

Použije se vhodný stupeň ředění, aby počet kolonie tvořících jednotek byl v doporučených mezích použité metody.

Doporučené živné půdy jsou uvedeny dále.

Příprava vzorku

Látky rozpustné ve vodě. 10 g nebo 10 ml zkoušené látky se rozpustí nebo zředí v tlumivém roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0 (viz dále) nebo v jiné vhodné tekutině, která v podmínkách zkoušky nemá protimikrobní účinek, a doplní se jí na 100 ml (povaha některých látek vyžaduje použít větší objem). Pokud je třeba, upraví se pH na asi 7.

Látky nerozpustné ve vodě (nelipofilní). 10 g nebo 10 ml zkoušené látky se suspenduje v tlumivém roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0 nebo jiné vhodné tekutině, která v podmínkách zkoušky nemá protimikrobní účinek a doplní se jí na 100 ml (povaha některých látek vyžaduje použít větší objem). Zkoušená látka se v případě potřeby rozdrtí a suspenze se mechanicky zhomogenizuje. Je možné přidat vhodnou, povrchově aktivní látku, např. ke špatně smáčivým látkám se může přidat polysorbát 80 v koncentraci 1 g/l k usnadnění tvorby suspenze. Pokud je třeba, upraví se pH na asi 7.

Látky lipofilní. 10 g nebo 10 ml zkoušené látky se zhomogenizuje s 5 g polysorbátu 20 nebo 80, přičemž se, pokud je to třeba, zahřeje na 40 °C (výjimečně lze v nezbytných případech zahřát po krátkou dobu na 45 °C). Při této teplotě se na vodní lázni nebo v sušárně dobře promíchá a přidá se 85 ml tlumivého roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0 zahřátého, pokud je to třeba, na nejvýše 40 °C. Tato teplota se udržuje jen po dobu potřebnou k vytvoření emulze a nesmí překročit 30 min. Pokud je třeba, upraví se pH emulze na asi 7.

Zkoušení vzorku

Membránová filtrace

Používají se membránové filtry s nominální velikostí pórů nejvýše 0,45 μm a jejichž účinnost zadržet bakterie byla ověřena. Filtry z dusičnanů celulosy se např. používají pro vodné, olejové a slabě lihové roztoky a filtry z octanu celulosy se např. používají pro silně lihové roztoky.

Dále popsaná metoda se vztahuje na použití membránových filtrů o průměru asi 50 mm. Pokud se použijí filtry jiného průměru, měly by se jim přizpůsobit objemy zřeďovacích a promývacích roztoků. Filtrační přístroj a membránové filtry se sterilizují vhodnými postupy. Přístroj je upraven tak, aby zkoušený roztok mohl být do něho naplněn a filtrován za aseptických podmínek a aby umožnil přenesení filtru na povrch živné půdy. Použijí se dva membránové filtry, na každý se přenese 10 ml nebo množství roztoku odpovídající 1 g zkoušeného vzorku a ihned se zfiltruje. Je-li třeba, zředí se zkoušený roztok tak, aby byl očekávaný počet kolonií 10 až 100. Oba filtry se promyjí nejméně třikrát asi 100 ml vhodné tekutiny, jako např. tlumivým roztokem s chloridem sodným a s peptonem o pH 7,0. Pro lipofilní látky může tato tekutina obsahovat vhodnou povrchově aktivní látku, jako je polysorbát 20 nebo 80. Jeden z filtrů, určený pro stanovení počtu bakterií, se přenese na povrch agarové půdy B a druhý, určený pro stanovení počtu hub, na povrch agarové půdy C. Půda B se inkubuje při teplotě 30 °C až 35 °C po dobu 5 dní a půda C při teplotě 20 °C až 25 °C též po dobu 5 dní, pokud není možný spolehlivější odečet v kratší době. Spočítají se vyrostlé kolonie a vypočítá se počet mikroorganismů na 1 g nebo 1 ml zkoušené látky, pokud je třeba zvlášť bakterie a zvlášť houby.

Počítání na pevných půdách

Pro bakterie. Používají se Petriho misky o průměru 9 cm až 10 cm; do každé se dá směs 1 ml zkoušeného roztoku a asi 15 ml agarové půdy B ohřáté na nejvýše 45 °C. Alternativně se zkoušený roztok rozetře na povrch ztuhlé půdy v Petriho misce o stejném průměru. Pokud je třeba, zředí se zkoušený roztok tak, aby počet kolonií nepřesahoval 300. Od každého ředění se připraví nejméně dvě Petriho misky a inkubují se při 30 °C až 35 °C po dobu 5 dní, pokud není možný spolehlivější odečet v kratší době. Spočítají se vyrostlé kolonie a vypočítá se výsledek z misky s nejvyšším počtem kolonií s přihlédnutím k tomu, že 300 kolonií na plotně je maximum pro správné vyhodnocení.

Pro houby. Používají se Petriho misky o průměru 9 cm až 10 cm; do každé se dá směs 1 ml zkoušeného roztoku a asi 15 ml agarové půdy C ohřáté na nejvýše 45 °C. Alternativně se zkoušený roztok rozetře na povrch ztuhlé půdy v Petriho misce o stejném průměru. Pokud je třeba, zředí se zkoušený roztok tak, aby počet kolonií nepřesahoval 100. S každým ředěním se připraví nejméně dvě Petriho misky a inkubují se při 20 °C až 25 °C po dobu 5 dní, pokud není možný spolehlivější odečet v kratší době. Spočítají se vyrostlé kolonie a vypočítá se výsledek z misek s počtem kolonií menším než 100.

Sériové ředění

Připraví se série dvanácti zkumavek, z nichž každá obsahuje 9 ml až 10 ml živné půdy A. Do každé z prvních tří zkumavek se přidá 1 ml 10krát zředěné, rozpuštěné nebo zhomogenizované látky, jak je popsáno výše. Do dalších tří zkumavek se přidá po 1 ml 100krát zředěné a do následujících tří po 1 ml 1000krát zředěné látky. Do posledních tří zkumavek se přidá po 1 ml rozpustidla. Zkumavky se inkubují při 30 °C až 35 °C nejméně po dobu 5 dnů. V posledních třech zkumavkách nemá dojít k růstu mikroorganismů. Pokud odečítání výsledků je nesnadné nebo nejisté z důvodů přítomnosti zkoušené látky, provede se vyočkování do tekuté půdy nebo na pevnou půdu a výsledky se odečítají až po další inkubační době. Nejpravděpodobnější počet mikrobů v 1 g nebo v 1 ml se stanoví z tabulky 2.6.12-1.

Tab. 2.6.12-1 Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů

Počet zkumavek s mikrobiálním růstem pro použité množství zkoušeného přípravku			Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů v 1 g (nebo v 1 ml)
100 mg nebo 0,1 ml ve zkumavce	10 mg nebo 0,01 ml ve zkumavce	1 mg nebo 0,001 ml ve zkumavce	
3	3	3	> 1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

Jestliže v prvním sloupci vykazují mikrobiální růst dvě zkumavky nebo méně, je nejpravděpodobnější počet mikroorganismů v 1 g (nebo v 1 ml) menší než 100.

Růstové vlastnosti půd a validita metod na stanovení počtu

Je-li třeba, postupuje se takto: dále uvedené testovací kmeny se kultivují 18 h až 24 h při 30 °C až 35 °C nebo pro *Candida albicans* 48 h při 20 °C až 25 °C ve zkumavkách s půdou A.

Staphylococcus aureus, např.	ATCC 6538 P (NCIB 8625, CIP 53.156, CCM 2022, CNCTC Mau 28/58)
nebo	ATCC 6538 (NCIB 9518, CIP 4.83, CCM 4516, CNCTC Mau 29/58)
Bacillus subtilis, např.	ATCC 6633 (NCIB 8054, CIP 52.62, CCM 1999, CNCTC Bs 8/58)
Escherichia coli, např.	ATCC 8739 (NCIB 8545, CIP 53.126, CCM 4517)
Candida albicans, např.	ATCC 2091 (CIP 1180.79, CCM 8226, CNCTC 55/79)
nebo	ATCC 10231 (NCPF 3179, CIP 48.72, CCM 8215, CNCTC 59/91)

Část vyrostlé kultury se zředí tlumivým roztokem s chloridem sodným a s peptonem o pH 7,0 tak, aby vzniklá suspenze obsahovala v 1 ml asi 100 živých zárodků.

Je-li třeba, použije se samostatně suspenze každého mikroorganismu jako kontrola metod na stanovení počtu zárodků za přidání a též za nepřítomnosti zkoušené látky.

Při ověřování metody se počet u každého testovaného mikroorganismu nesmí lišit o více než desetinásobek od vypočteného množství referenční suspenze. K ověření sterility půd, ředicího roztoku a aseptického provedení zkoušky se stanoví celkový počet živých aerobních zárodků za použití sterilního tlumivého roztoku s chloridem sodným a peptonem o pH 7,0 jako zkoušeného přípravku. Nemá v něm být prokázán žádný růst mikroorganismů.

Vyhodnocení výsledků

Je-li v článku uveden limit počtu, interpretuje se takto:
10^2 mikroorganismů - nejvyšší přípustná hodnota je $5 . 10^2$;
10^3 mikroorganismů - nejvyšší přípustná hodnota je $5 . 10^3$ atd.

Následující část se uvádí pro informaci a jako vodítko; netvoří závaznou součást celkové metody.

Doporučené živné půdy a roztoky

Následující roztok a živné půdy byly shledány dostatečnými pro účely, pro které jsou v lékopise předepsány pro zkoušku na mikrobiální znečištění. Jiné půdy mohou být použity, mají-li podobné výživné a selektivní vlastnosti pro mikroorganismy, které se mají zjišťovat.

Tlumivý roztok s chloridem sodným a s peptonem o pH 7,0

dihydrogenfosforečnan draselný	3,56 g[5)]
hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	7,23 g[5)]
chlorid sodný	4,30 g[5)]
pepton (z masa nebo kaseinu)	1,0 g
voda	1000 ml

Může se přidat polysorbát 20 nebo 80 (1 g/l až 10 g/l). Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.

Tekutá půda A (půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu)

pankreatický hydrolyzát kaseinu	17,0 g
papainový hydrolyzát sóji	3,0 g
chlorid sodný	5,0 g
hydrogenfosforečnan draselný	2,5 g
glukosa monohydrát	2,5 g
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 7,3 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.

Agarová půda B (agarová půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu)

pankreatický hydrolyzát kaseinu	15,0 g
papainový hydrolyzát sóji	5,0 g
chlorid sodný	5,0 g
agar	15,0 g
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 7,3 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.

Agarová půda C (Sabouraudův glukosový agar s antibiotiky)

pepton (z masa a kaseinu)	10,0 g
glukosa monohydrát	40,0 g
agar	15,0 g
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 5,6 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C. Bezprostředně před použitím se přidá 0,10 g sodné soli benzylpenicillinu a 0,10 g tetracyklinu na 1 l půdy ve formě sterilního roztoku nebo e přidá 50mg chloramfenikolu na 1l půdy před sterilizací.

[5)] odpovídá 0,067 mol/l

Tekutá půda D (laktosová půda)

masový výtažek	3,0 g
pankreatický hydrolyzát želatiny	5,0 g
laktosa	5,0 g
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 6,9 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C a ihned se ochladí.

Obohacená tekutá půda E (Mosselova obohacená půda pro Enterobacteriaceae)

pankreatický hydrolyzát želatiny	10,0 g
glukosa mohohydrát	5,0 g
sušená hovězí žluč	20,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný	2,0 g
hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	8,0 g
brilantní zeleň	15 mg
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po zahřátí bylo 7,2 ± 0,2. Zahřívá se 30 min při 100 °C a ihned se ochladí.

Agarová půda F (žlučový agar s glukosou, krystalovou violetí a neutrální červení)

kvasničný výtažek	3,0 g
pankreatický hydrolyzát želatiny	7,0 g
žlučové soli	1,5 g
laktosa	10,0 g
chlorid sodný	5,0 g
glukosa monohydrát	10,0 g
agar	15,0 g
neutrální červeň	30 mg
krystalová violeť	2 mg
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po zahřátí bylo 7,4 ± 0,2. Zahřeje se k varu; nelze zahřívat v autoklávu.

Tekutá půda G (MacConkeyova půda)

pankreatický hydrolyzát želatiny	20,0 g
laktosa	10,0 g
sušená hovězí žluč	5,0 g
bromkresolová červeň	10 mg
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 7,3 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.

Agarová půda H (MacConkeyův agar)

pankreatický hydrolyzát želatiny	17,0 g
pepton (z masa a kaseinu)	3,0 g
laktosa	10,0 g
chlorid sodný	5,0 g
žlučové soli	1,5 g
agar	13,5 g
neutrální červeň	30 mg
krystalová violeť	1 mg
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po sterilizaci bylo 7,1 ± 0,2. Za stálého třepání se povaří 1 min a pak se sterilizuje 15 min v autoklávu při 121 °C.

Tekutá půda I (tetrathionanová půda se žlučí a brilantní zelení)

pepton	8,6 g
sušená hovězí žluč	8,0 g
chlorid sodný	6,4 g
uhličitan vápenatý	20,0 g
tetrathionan draselný	20,0 g
brilantní zeleň	70 mg
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby bylo po zahřátí 7,0 ± 0,2. Zahřeje se právě k varu. Nelze opakovaně zahřívat.

Agarová půda J (deoxycholano-citronanový agar)

masový výtažek	10,0 g
pepton z masa	10,0 g
laktosa	10,0 g
citronan sodný	20,0 g
citronan železitý	1,0 g
deoxycholan sodný	5,0 g
agar	13,5 g
neutrální červeň	20 mg
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po zahřátí bylo 7,3 ± 0,2. Povaří se 1 min, ochladí na 50 °C a rozplní se do Petriho misek. Nelze zahřívat v autoklávu.

Agarová půda K (deoxycholanový agar s xylosou a lysinem)

xylosa	3,5 g
L-lysin	5,0 g
laktosa	7,5 g
sacharosa	7,5 g
chlorid sodný	5,0 g
kvasničný výtažek	3,0 g
fenolová červeň	80 mg
agar	13,5 g
deoxycholan sodný	2,5 g
thiosíran sodný	6,8 g
citronan amonno-železitý	0,8 g
voda	1000 ml

pH se upraví tak, aby po zahřátí bylo 7,4 ± 0,2. Zahřeje se k varu, ochladí na 50 °C a rozplní se do Petriho misek. Nelze zahřívat v autoklávu.

Agarová půda L (agar s brilantní zelení, fenolovou červení, laktosou a sacharosou)

pepton (z masa a kaseinu)	10,0 g
kvasničný výtažek	3,0 g
chlorid sodný	5,0 g
laktosa	10,0 g
sacharosa	10,0 g

agar	20,0 g
fenolová červeň	80 mg
brilantní zeleň	12,5 mg
voda	1000 ml

Povaří se 1 min. Hodnota pH se upraví tak, aby po sterilizaci byla 6,9 ± 0,2. Bezprostředně před použitím se sterilizuje 15 min v autoklávu při 121 °C, ochladí se na 50 °C a rozplní se do Petriho misek.

Agarová půda M (agarová půda se třemi cukry a železem)

masový výtažek	3,0 g
kvasničný výtažek	3,0 g
pepton (z masa a kaseinu)	20,0 g
chlorid sodný	5,0 g
laktosa	10,0 g
sacharosa	10,0 g
glukosa monohydrát	1,0 g
citronan amonno-železitý	0,3 g
thiosíran sodný	0,3 g
fenolová červeň	25 mg
agar	12,0 g
voda	1000 ml

Za stálého třepání se zahřeje a 1 min se povaří. Hodnota pH se upraví tak, aby po sterilizaci byla 7,4 ± 0,2. Rozplní se do zkumavek do 1/3 jejich výšky, sterilizuje se v autoklávu 15 min při 121 °C a ochladí se v takové poloze, při které má půda dostatečnou hloubku a šikmý povrch.

Agarová půda N (cetrimidový agar)

pankreatický hydrolyzát želatiny	20,0 g
chlorid hořečnatý	1,4 g
síran draselný	10,0 g
cetrimid	0,3 g
agar	13,6 g
voda	1000 ml
glycerol	10,0 ml

Za stálého třepání se zahřeje a 1 min se povaří. Hodnota pH se upraví tak, aby po sterilizaci byla 7,2 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.

Agarová půda O (Baird-Parkerův agar)

pankreatický hydrolyzát kaseinu	10,0 g
masový výtažek	5,0 g
kvasničný výtažek	1,0 g
chlorid lithný	5,0 g
agar	20,0 g
glycin	12,0 g
pyruvan sodný	10,0 g
voda	950 ml

Za stálého třepání se zahřeje a 1 min se povaří. Hodnota pH se upraví tak, aby po sterilizaci byla 6,8 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C, ochladí se na 45 °C až 50 °C a přidá 10 ml sterilního roztoku teluričitanu draselného (10 g/l) a 50 ml emulze vaječného žloutku.

Půda P (obohacená půda pro klostridia)

masový výtažek	10,0 g
pepton	10,0 g
kvasničný výtažek	3,0 g
rozpustný škrob	1,0 g
glukosa monohydrát	5,0 g
cysteiniumchlorid	0,5 g
chlorid sodný	5,0 g
octan sodný	3,0 g
agar	0,5 g
voda	1000 ml

Agar se nechá nabobtnat a rozpustí se zahřátím k varu za stálého míchání. Je-li třeba, upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci byla asi 6,8. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C.

Půda Q (Columbia agar)

pankreatický hydrolyzát kaseinu	10,0 g
peptický hydrolyzát masa	5,0 g
pankreatický hydrolyzát srdce	3,0 g
kvasničný výtažek	5,0 g
kukuřičný škrob	1,0 g
chlorid sodný	5,0 g
agar, podle schopnosti tvořit gel	10,0 až 15,0 g
voda	1000 ml

Agar se nechá nabobtnat a rozpustí se zahřátím k varu za stálého míchání. Je-li třeba, upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci byla 7,3 ± 0,2. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C. Ochladí se na 45 °C až 50 °C; je-li třeba, přidá se gentamiciniumsulfat v množství odpovídajícím 20 mg báze gentamicinu a rozplní se do Petriho misek.

Půda R (laktoso-siřičitanová půda)

pankreatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g
kvasničný výtažek	2,5 g
chlorid sodný	2,5 g
laktosa	10,0 g
cysteiniumchlorid	0,3 g
voda	1000 ml

Po rozpuštění se upraví pH na 7,1 ± 0,1 a rozplní se po 8 ml do zkumavek délky 160 mm a průměru 16 mm a obsahujících malou Durhamovu zkumavku. Sterilizuje se 15 min v autoklávu při 121 °C a uchovává se při 4 °C. Před použitím se půda zahřívá 5 min ve vodní lázni a ochladí se. Do každé zkumavky se přidá 0,5 ml roztoku disiřičitanu sodného (12 g/l) a 0,5 ml roztoku citronanu železito-amonného (10 g/l). Oba roztoky se připraví v čas potřeby a filtrují se přes membránový filtr (0,45 μm).

2.6.13 Zkoušky na specifické mikroorganismy

Enterobakterie a určité jiné gramnegativní bakterie

Důkaz. Zkoušený přípravek se zpracuje postupem uvedeným v části *2.6.12*, ale místo tlumivého roztoku s chloridem sodným a peptonem o pH 7,0 se použije živná půda D. Zhomogenizuje se a

inkubuje při 35 °C až 37 °C po dobu postačující k oživení bakterií, ale nepostačující k jejich pomnožení (obvykle 2 h, ale ne více než 5 h). Tekutina se protřepe, homogenizát a množství odpovídající 1 g nebo 1 ml zkoušené látky se přenese do 100 ml pomnožovací půdy E a inkubuje 18 h až 48 h při 35 °C až 37 °C. Potom se vyočkuje na misky s agarovou půdou F a inkubuje se 18 h až 24 h při 35 °C až 37 °C. Přípravek vyhovuje, jestliže na žádné misce nevyrostou kolonie gramnegativních bakterií.

Kvantitativní stanovení. Do vhodných množství živné půdy E se přidají z homogenizátu a nebo roztoku zkoušeného přípravku množství odpovídající 1,0 g, 0,1 g a 0,01 g nebo 1,0 ml, 0,1 ml a 0,01 ml přípravku. Inkubuje se 24 h až 48 h při 35 °C až 37 °C. Z každé kultury se pro dosažení selektivní izolace provede vyočkování na agarovou půdu F. Inkubuje se 18 h až 24 h při 35 °C až 37 °C. Růst dobře vyvinutých, červených nebo načervenalých kolonií gramnegativních bakterií se hodnotí jako pozitivní výsledek. Zaznamená se nejmenší množství zkoušeného přípravku, které dává pozitivní výsledek, a největší množství zkoušeného přípravku, které dává negativní výsledek.

Z tabulky 2.6.13-1 se stanoví pravděpodobný počet bakterií.

Tab. 2.6.13-1

Výsledky pro množství přípravku			Pravděpodobný počet bakterií v 1 g přípravku
1 g nebo 1 ml	0,1 g nebo 0,1 ml	0,01 g nebo 0,01 ml	
+	+	+	více než 10^2
+	+	-	méně než 10^2 a více než 10
+	-	-	méně než 10 a více než 1
-	-	-	méně než 1

Escherichia coli

Do 100 ml živné půdy G se přidá objem kultury připravený jako pro zkoušku na enterobakterie a jiné vybrané gramnegativní bakterie v živné půdě D, v množství odpovídajícím 1 g nebo l ml zkoušené látky. Inkubuje se 18 h až 24 h při 43 °C až 45 °C. Vyočkuje se na agarovou půdu H a inkubuje se 18 h až 24 h při 43 °C až 45 °C. Nárůst červených, obvykle nemukózních kolonií gramnegativních tyčinek, obklopených někdy načervenalou precipitační zónou, indikuje možnou přítomnost *E. coli*. Tento výsledek je možné potvrdit tvorbou indolu při (44 ± 0,5) °C nebo jinými biochemickými reakcemi. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže žádné takovéto kolonie nejsou pozorovány nebo když jsou potvrzující biochemické zkoušky negativní.

Salmonella

Množství odpovídající 10 g nebo 10 ml zkoušené látky se inkubuje 5 h až 24 h v půdě D při 35 °C až 37 °C, aby se zajistilo optimální obohacení. 10 ml obohacené kultury se přenese do 100 ml živné půdy I a inkubuje se 18 h až 24 h při 42 °C až 43 °C. Potom se vyočkuje na nejméně dvě různé pevné půdy, vybrané z agarové půdy J, agarové půdy K a agarové půdy L. Inkubuje se 24 h až 48 h při 35 °C až 37 °C. Pravděpodobná přítomnost salmonel je indikována růstem kolonií tohoto vzhledu:

- na půdě J: dobře rozvinuté bezbarvé kolonie,
- na půdě K: dobře rozvinuté červené kolonie s černým středem nebo bez něho,
- na půdě L: malé průsvitné bezbarvé nebo růžové až matně bílé kolonie, často obklopené růžovou nebo červenou zónou.

K potvrzení nálezu se samostatně naočkuje několik podezřelých kolonií na povrch a vpichem do agarové půdy M. Přítomnost salmonel je předběžně potvrzena, jestliže uvnitř půdy, ale nikoliv na jejím povrchu, dojde ke změně barvy z červené na žlutou a obvykle též ke tvorbě plynu. Tvoří se nebo též netvoří sirovodík. Potvrzení se může zpřesnit vhodnými biochemickými a sérologickými zkouškami. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se nenajdou kolonie popsaného typu nebo jestliže jsou potvrzující biochemické a sérologické zkoušky negativní.

Pseudomonas aeruginosa

Do 100 ml živné půdy A se dá 10 ml upraveného zkoušeného vzorku (viz *2.6.12*) nebo množství odpovídající 1 g nebo 1 ml přípravku. Promíchá se a inkubuje 24 h až 48 h při 35 °C až 37 °C. Potom se vyočkuje na agarovou půdu N a inkubuje se 24 h až 48 h při 35 °C až 37 °C. Není-li zjištěn růst mikroorganismů, přípravek vyhovuje. Jestliže vyrostou gramnegativní tyčinky, obvykle se zelenavou fluorescencí, provede se oxidasová zkouška a sleduje se, zda dojde k růstu v půdě A při 42 °C. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se nezjistí kolonie popsaného typu a jestliže je ověřovací biochemická zkouška negativní.

Staphylococcus aureus

Připraví se obohacená kultura, jak je uvedeno u *Ps. aeruginosa*, a vyočkuje se na vhodnou půdu, např. na agarovou půdu O. Inkubuje se 24 h až 48 h při 35 °C až 37 °C. Není-li pozorován žádný růst, přípravek vyhovuje. Černé kolonie grampozitivních koků, často obklopené jasnými zónami, mohou indikovat přítomnost *S. aureus*. Ty mohou být potvrzeny jako katalasa-pozitivní koky, a dále např. koagulasovou a deoxyribonukleasovou zkouškou. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se neobjeví popsané kultury nebo jestliže jsou ověřovací biochemické zkoušky negativní.

Růstové a selektivní vlastnosti půd a validace zkoušky na specifické mikroorganismy

Pokud je třeba, postupuje se takto: dále uvedené kmeny se odděleně kultivují 18 h až 24 h ve zkumavkách v uvedených půdách při 30 °C až 35 °C.

Staphylococcus aureus, např.	ATCC 6538P (NCIB 8625, CIP 53.156, CCM 2022, CNCTC Mau 28/58)	půda A
nebo	ATCC 6538 (NCIB 9518, CIP 4.83, CCM 4516, CNCTC Mau 29/58)	půda A
Pseudomonas aeruginosa, např.	ATCC 9027 (NCIB 8626, CIP 82.118, CCM 1961, CNCTC Ps 37/65)	půda A
Escherichia coli, např.	ATCC 8739 (NCIB 8545, CIP 53.126, CCM 4517)	půda D
Salmonella typhimurium[6)]		půda D

Část roztoku každé kultury se zředí tlumivým roztokem s chloridem sodným a peptonem o pH 7,0 tak, aby suspenze obsahovala asi 1000 živých zárodků v 1 ml. Smíchají se stejné díly od všech suspenzí a použije se 0,4 ml (přibližně 100 mikroorganismů od každého kmene) jako inokulum ve zkouškách na *E. coli*, *Salmonelly*, *Ps. aeruginosa* a *S. aureus*, a to za přítomnosti i nepřítomnosti zkoušeného přípravku, je-li to nutno.Použitá metoda má umožnit důkaz hledaného mikroorganismu.

[6)] Nedoporučuje se žádný určitý kmen. Může se použít nějaká pro člověka nepatogenní salmonela, např. *Salmonella abony* (NCTC 6017, CIP 80.39, CCM 4518).

Klostridie

Dále popsané zkoušky jsou určeny pro vymezené účely. První metoda je určena pro přípravky, u nichž je nezbytné vyloučit přítomnost patogenních klostridií, a které je proto nutno zkoušet na jejich nepřítomnost. Tyto přípravky mají obecně nízký celkový počet zárodků. Druhá metoda je semikvantitativním stanovením *Clostridium perfringens* a je určena pro přípravky, kde množství tohoto druhu je kritériem jejich kvality.

1. Zkouška na klostridie. Zkoušený přípravek se zpracuje tak, jak je uvedeno v části *2.6.12.* Připraví se dvě stejné dávky odpovídající 1 g nebo 1 ml zkoušeného přípravku. Jedna se zahřívá na 80 °C po dobu 10 min a potom se rychle ochladí. Po protřepání se z ní naočkuje 10 ml do zkumavky (38 mm x 200 mm) nebo do jiné vhodné nádoby obsahující 100 ml živné půdy P. Druhá dávka se nezahřívá a naočkuje se stejným způsobem do druhé zkumavky. Obě zkumavky se inkubují za anaerobních podmínek 48 h při 35 °C až 37 °C. Po inkubaci se obě zkumavky vyočkují na živnou půdu Q, do níž byl přidán gentamicin, a inkubují se opět 48 h při 35 °C až 37 °C. Přípravek vyhovuje, jestliže není pozorován růst mikroorganismů.

Je-li pozorován růst, přeočkuje se každá odlišná kolonie na živnou půdu Q bez gentamicinu a inkubuje se za aerobních a anaerobních podmínek. Dojde-li jenom k anaerobnímu růstu grampozitivních tyčinek (s endosporami nebo bez nich) s negativní katalasovou reakcí, indikuje to přítomnost rodu *Clostridium*. Je-li to nutné, porovná se růst kolonií na obou plotnách a použije se katalasová zkouška k vyloučení aerobních a fakultativně anaerobních druhů rodu *Bacillus*, které dávají pozitivní katalasovou reakci. Tato zkouška může být provedena na rozlišení stejných kolonií na agarové půdě nebo nepřímo po přenesení kolonie na podložní sklíčko přidáním kapky *peroxidu vodíku zředěného RS*. Tvorba bublinek plynu indikuje pozitivní katalasovou reakci.

2. Stanovení počtu Clostridium perfringens. Zkoušený přípravek se zpracuje tak, jak je popsáno v části *2.6.12*, a připraví se ještě stonásobné a tisícinásobné zředění v tlumivém roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0.

Stanoví se nejpravděpodobnější počet mikrobů tak, jak je popsáno při stanovení celkového počtu živých aerobních mikrobů (*2.6.12*). Přenese se vždy 1 ml zhomogenizovaného roztok do zkumavky (16 mm x 160 mm) nebo jiné vhodné nádoby obsahující 9 ml živné půdy R a malou Durhamovu zkumavku. Opatrně se promíchá a inkubuje při (45 ± 0,5) °C po dobu 24 h až 48 h.

Zkumavky, které zčernají od sirníku železitého a v nichž je Durhamova zkumavka naplněna plynem nejméně v jedné desetině objemu, indikují přítomnost *Cl. perfringens*. Nejpravděpodobnější počet *Cl. perfringens* se odečte z tabulky 2.6.12-1.

Ke kontrole se použijí tyto kmeny:

pro 1. metodu *Clostridium sporogenes*, např.	ATCC 19404 (NCTC 532, CIP 79.03, CCM 4409, CNCTC Cl 66/79);
pro 2. metodu *Clostridium perfringens*, např.	ATCC 13124 (NCIB a NCTC 6125, CIP 103.409, CCM 4435, CNCTC Cl 68/83).

Je-li to nutné, použije se *Cl. sporogenes* ke kontrole selektivity a anaerobních podmínek.

2.6.14 Bakteriální endotoxiny

Ve zkoušce na bakteriální endotoxiny (LAL-test) se používá lyzát z amébocytů ostrorepa, *Limulus polyphemus*. Po přidání roztoku s obsahem endotoxinů k roztoku lyzátu vzniká ve směsi zákal, sraženina nebo gel. Rychlost reakce závisí na koncentraci endotoxinu, hodnotě pH a teplotě.

K reakci je nutná přítomnost některých dvojmocných iontů, pro-enzymatického srážecího komplexu a srážlivého proteinu, které jsou obsaženy v lyzátu.

V článcích jsou uvedeny požadavky na obsah bakteriálních endotoxinů jako limitní koncentrace endotoxinu; přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže má nejvýše limitní koncentraci endotoxinu. Splnění tohoto požadavku může být ale doloženo jedině důkazem, že koncentrace endotoxinu v přípravku je nižší než limitní koncentrace endotoxinu. Zkouška se provádí způsobem, který vylučuje mikrobiální kontaminaci.

Před provedením zkoušky na endotoxiny se u zkoušeného vzorku ověří:
- zda použité zařízení neadsorpuje endotoxiny;
- citlivost lyzátu (λ);
- nepřítomnost interferujících faktorů.

Je-li třeba, očistí se laboratorní zařízení od endotoxinů.

Ve zkoušce se používají tato zkoumadla a referenční přípravek.

Referenční přípravek endotoxinu BRP. Je kalibrován v mezinárodních jednotkách porovnáním s mezinárodním standardem.

Lyzát z amébocytů limula. Lyzát se rozpustí podle návodu. U každé šarže se ověří deklarovaná citlivost (λ), jak je předepsáno v části *Citlivost lyzátu.*

Citlivost lyzátu je definována jako nejnižší koncentrace endotoxinu, při které dojde v podmínkách zkoušky ke vzniku pevného gelu, a vyjadřuje se počtem endotoxinových jednotek v mililitru.

Voda pro LAL. Voda má požadovanou jakost, jestliže v podmínkách předepsaných pro zkoušku na endotoxin ve zkoušeném přípravku dává negativní výsledek. Je možno ji připravit trojnásobnou destilací vody na přístroji vybaveném účinným zařízením, které zabraňuje hromadění kapek, nebo jinými prostředky dávajícími vodu požadované jakosti.

Kyselina chlorovodíková pro LAL 0,1 mol/l RS a hydroxid sodný pro LAL 0,1 mol/l RS. Připravují se z *kyseliny chlorovodíkové R* a *hydroxidu sodného R* a *vody pro LAL*. Obě látky jsou vhodné pro zkoušku, jestliže po úpravě pH na 6,5 až 7,5 dávají v podmínkách zkoušky negativní výsledek.

Postup zkoušky

Pokud není stanoveno jinak, provádí se příprava roztoků pro zkoušku a jejich ředění vodou pro LAL.

Je-li třeba, upraví se pH zkoušeného roztoku *kyselinou chlorovodíkovou pro LAL 0,1 mol/l RS, hydroxidem sodným pro LAL 0,1 mol/l RS* nebo vhodným tlumivým roztokem na hodnotu 6,5 - 7,5. Odpovídající objem lyzátu se nakape na vhodný povrch (např. podložní sklo nebo zkumavka) předmětů vyhřátých na teplotu (37 ± 1) °C. V dostatečně dlouhých intervalech umožňujících odečtení jednotlivých výsledků se k jednotlivým lyzátům přidá stejný objem zkoušeného roztoku a ihned se opatrně smíchá s lyzátem. Reakční směs se za vyloučení vibrací a odpařování vody inkubuje po konstantní dobu, která byla zjištěna experimentálně (obvykle 20 min až 60 min) a poté se odečtou výsledky. Jako pozitivní se hodnotí tvorba pevného gelu, který se nerozpadne při opatrném otočení nádoby. Výsledek je negativní, jestliže se takový gel nevytvoří.

Citlivost lyzátu. Připraví se nejméně čtyři sériová dvojnásobná ředění *referenčního přípravku endotoxinu BRP* tak, aby v jednotlivých ředěních byla dosažena koncentrace 2 λ, λ, 0,5 λ a 0,25 λ, kde λ je deklarovaná citlivost použitého lyzátu. Alespoň v posledním ředění každé série musí být negativní výsledek. Zkouší se ředění a negativní kontrolní roztok, kterým je voda pro LAL, postupem uvedeným v části Postup zkoušky. Vypočítá se průměr logaritmů nejnižší koncentrace endotoxinu v každé sérii ředění, u které došlo k pozitivní reakci. Antilogaritmus tohoto průměru vyjadřuje citlivost lyzátu. Pokud se její hodnota neliší o více než o dvojnásobek od hodnoty deklarované, je citlivost ověřena a používá se ve všech zkouškách prováděných s tímto lyzátem.

Interferující faktory. Postupuje se stejně, jak je popsáno v části Citlivost lyzátu, ale připraví se ředění *referenčního přípravku endotoxinu BRP* v neošetřených vzorcích zkoušeného přípravku neobsahujících už zjistitelný endotoxin. Tyto vzorky se použijí v nejvyšším účinném ředění (MVD), které se vypočítá ze vzorce:

$$MVD = \frac{\textit{limitní koncentrace endotoxinu}}{\textit{citlivost lyzátu}}$$

Obě hodnoty jsou vyjádřeny v mezinárodních jednotkách endotoxinu na mililitr.

Jestliže je limitní koncentrace endotoxinu v jednotlivém lékopisném článku uvedena v mezinárodních jednotkách endotoxinu v mililitru přípravku nebo v mezinárodní jednotce přípravku, vynásobí se limit endotoxinu koncentrací přípravku v zkoušeném roztoku (v miligramech na ml nebo v mezinárodních jednotkách zkoušeného přípravku na mililitr), aby se získala limitní koncentrace endotoxinu v mezinárodních jednotkách endotoxinu v mililitru zkoušeného přípravku. Výše popsaný postup násobení se použije u roztoků připravených rozpuštěním podle návodu uvedeného na štítku.

Jestliže se citlivost lyzátu stanovená v přítomnosti zkoušeného přípravku neliší více než dvojnásobně od citlivosti stanovené bez přítomnosti zkoušeného přípravku, pak přípravek neobsahuje faktory, které interferují v experimentálních podmínkách, a může se zkoušet bez dalších úprav. Jinak se u přípravků, které způsobují inhibici nebo aktivaci, musí interferující faktory odstranit vhodným způsobem, jako je ředění, filtrace, neutralizace, dialýza nebo přidání látek schopných uvolnit adsorpované endotoxiny. Použití citlivějšího lyzátu umožňuje vyšší ředění zkoušeného přípravku a usnadňuje tak odstranění interference.

Ultrafiltraci je možno použít tehdy, jestliže interferující faktory procházejí filtrem s nominálním separačním limitem odpovídajícím relativní molekulové hmotnosti 10 000 až 20 000. Je možno použít asymetrické membránové filtry z triacetatcelulosy, které se však musí přezkoušet na přítomnost složek způsobujících falešně pozitivní výsledky. Látky zachycené na filtru, které obsahují endotoxin, se opláchnou vodou pro LAL nebo vhodným tlumivým roztokem. Zkoušený objem a konečný objem pro zpětné uvolnění endotoxinu jsou přesně stanoveny pro každý zkoušený přípravek.

Pro ověření, že zvolený způsob účinně odstraňuje interferenci a přitom neodstraňuje endotoxiny, se zkouška na interferující vlivy opakuje s přípravkem, ke kterému se přidá *referenční přípravek endotoxinu BRP*, a použije se jeden ze způsobů na odstranění interferujících faktorů.

Stanovení endotoxinu ve zkoušeném vzorku. Pracuje se ve dvojicích, jak je popsáno v části Postup zkoušky, při použití maximálního účinného ředění zkoušeného přípravku, který byl ještě podroben některému ze způsobů odstranění interferujících faktorů. Zároveň se zkouší negativní kontrola složená z *vody pro LAL* a dvě pozitivní kontroly, které obsahují *referenční přípravek endotoxinu BRP* v koncentraci odpovídající dvojnásobku uvedené citlivosti lyzátu a z toho jedna obsahuje zkoušený přípravek (podrobený, je-li třeba, postupu k odstranění interferujících faktorů po přidání referenčního endotoxinu) v koncentraci použité ve zkoušce. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže negativní a obě pozitivní kontroly dávají odpovídající výsledek.

Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže obě zkoušené směsi dávají negativní výsledek. Zkoušený přípravek nevyhovuje zkoušce, jestliže obě zkoušené směsi dávají pozitivní výsledek. Jestliže je pozitivní výsledek pouze v jedné zkoušené směsi a ve druhé negativní, zkouška se opakuje: zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže v obou zkoušených směsích je zjištěn negativní výsledek.

Následující část je uvedena pro informaci a jako návod; netvoří závaznou součást lékopisu.

Zkouška na bakteriální endotoxin: směrnice

1. Úvod

Endotoxiny pocházející z gramnegativních bakterií jsou nejčastější příčinou toxických reakcí přisuzovaných kontaminaci farmaceutických přípravků pyrogenními látkami: pyrogenní účinnost endotoxinů je mnohem vyšší než účinnost jiných pyrogenních látek. Endotoxiny jsou lipopolysacharidy. Ačkoli množství pyrogenních látek s odlišnou strukturou je malé, obecně platí, že nepřítomnost bakteriálních endotoxinů v přípravku je známkou absence pyrogenních složek za předpokladu, že lze vyloučit přítomnost neendotoxinových pyrogenních látek.

Přítomnost endotoxinu v přípravku může být zakryta faktory interferujícími s reakcí mezi amébocytárním lyzátem a endotoxiny. Proto analytik, chce-li nahradit zkoušku na pyrogenní látky na králících, která je požadována lékopisným článkem, zkouškou na endotoxin, prokáže, že přípravek lze zkoušet validovaným způsobem, který může obsahovat postup na odstranění interferujících faktorů.

Jak je uvedeno ve zkoušce na bakteriální endotoxiny, je třeba mít dostatečné informace o následujících aspektech dříve, než bude zkouška se vzorkem uznána za validovanou:

1.1 Prokáže se vhodnost materiálů ke zkoušce. Má se prokázat nepřítomnost endotoxinu ve vodě pro LAL a v ostatních zkoumadlech a má se ověřit citlivost lyzátu deklarovaná výrobcem.

1.2 Protože zkoušený přípravek může ve zkoušce interferovat, přezkouší se citlivost lyzátu v nepřítomnosti i v přítomnosti zkoušeného přípravku. Mezi oběma hodnotami citlivosti se nezjistí signifikantní rozdíl.

Zkouška na bakteriální endotoxin uvádí též způsob odstranění interferujících faktorů; v případě interference se provede další zkouška, aby se ověřilo, zda použitá metoda skutečně neutralizovala nebo odstranila interferenci.

Jestliže zkoušený vzorek nevyhovuje zkoušce, je možno zkoušku opakovat. Zřejmé nevyhovění přípravku požadavkům zkoušky může být způsobeno chybou v jeho přípravě nebo ředění nebo jinou náhodnou laboratorní kontaminací.

V této části jsou vysvětleny důvody pro požadavky obsažené ve zkoušce na bakteriální endotoxiny a potom je pojednáno o odečítání a interpretaci výsledků.

Nahrazení lékopisné zkoušky na pyrogenní látky prováděné na králících LAL-testem v podstatě představuje použití alternativní metody analýzy, a vyžaduje proto validaci. Některé pokyny k jejímu provedení jsou uvedeny v této části.

Použití kvantitativní metody pro stanovení koncentrace endotoxinu místo limitní zkoušky rovněž vyžaduje validaci, což bude diskutováno dále.

Ačkoli ve zkoušce na bakteriální endotoxiny je určen jako zdroj lyzátu druh *Limulus polyphemus*, je možno aktivní lyzát též získat z blízce příbuzných druhů, jako je rod *Tachypleus*. Výraz "amébocytární lyzát" se v textu používá pro označení validovaného amébocytárního lyzátu bez ohledu na jeho biologický původ.

2. Metoda

Ačkoliv přidání endotoxinu k roztoku amébocytárního lyzátu může vést ke vzniku zákalu, sraženiny nebo gelu, lékopisná zkouška používá ke zjištění limitu pouze gelovou metodu. Důvod je zčásti historický, zčásti je dán jednoduchostí rozhodnutí, zda zkoušený přípravek vyhovuje nebo nevyhovuje na základě vzniku nebo nepřítomnosti gelu. Kvantitativní metody založené na stupni zákalu nebo koncentraci barviva uvolněného z chromogenního peptidu se pro zkoušku kvality mohou upravit po validaci, což bude diskutováno dále.

Endotoxiny se mohou adsorpovat na povrch zkumavek nebo pipet z určitých plastů nebo typů skla. Uvolnění látek z plastických materiálů může vyvolat interferenci. Proto se mají používané materiály kontrolovat; složení následujících šarží zkumavek nebo pipet se mohou mírně lišit, a proto se doporučuje, aby laboratorní pracovník opakoval takové zkoušení u každé nové šarže materiálů.

Zatímco výsledky zkoušky na pyrogenní látky na králících jsou závislé na dávce pyrogenu, výsledky zkoušky na bakteriální endotoxiny závisí na koncentraci endotoxinu ve směsi. Rozhodnutí použít zkoušku na bakteriální endotoxin jako limitní zkoušku je dáno tím, že za prvé musí být definována prahová koncentrace endotoxinu pro zkoušený přípravek a za druhé analytik provádějící zkoušku má vědět, kdy je koncentrace endotoxinu v přípravku pod nebo nad hranicí této prahové hodnoty, a nikoliv zda koncentrace endotoxinu v produktu bude v jednotkách endotoxinu na objem, hmotnost nebo dávku.

Při stanovování prahové koncentrace endotoxinu u zkoušeného přípravku je nutno brát zřetel na lidskou dávku přípravku, s cílem mít jistotu, že pokud je koncentrace endotoxinu v přípravku pod prahovou hodnotou, pak výsledná maximální dávka podaná odpovídajícím způsobem za hodinu neobsahuje dostatečné množství endotoxinu k rozvoji toxické reakce.

Jestliže je koncentrace endotoxinu v přípravku přesně rovna prahové hodnotě, dojde ke vzniku gelu jako v případě, kdy je koncentrace endotoxinu mnohem vyšší a přípravek nevyhoví zkoušce, protože nelze rozlišit mezi koncentrací přesně se rovnající prahové koncentraci a mezi koncentrací vyšší. Pouze v případě, kdy nedojde ke vzniku gelu, může analytik rozhodnout, že koncentrace endotoxinu nepřesáhla koncentraci prahovou.

U pevných přípravků je třeba prahovou koncentraci endotoxinu na jednotku hmotnosti nebo mezinárodní jednotku přípravku převést na koncentraci endotoxinu v mililitru zkoušeného roztoku, neboť zkoušku lze provádět pouze u roztoků. Přípravky, které existují pouze v tekutém stavu, jako jsou infuzní roztoky, budou probrány později.

Stanovení prahové koncentrace endotoxinu v mezinárodních jednotkách endotoxinu v jednotce přípravku (jednotka hmotnosti nebo mezinárodní jednotka) vyžaduje definovat:

M - maximální dávka přípravku pro dospělé vyjádřená v jednotkách hmotnosti nebo mezinárodních jednotkách na kilogram tělesné hmotnosti za hodinu. Při stanovování maximální dávky pro dospělé má být použita hmotnost 70 kg pro dospělou osobu. Dětská dávka na kilogram hmotnosti za hodinu má být použita jen v případě, je-li vyšší než odpovídající dávka pro dospělé;

K - maximální dávka endotoxinu v mezinárodních jednotkách endotoxinu na kilogram tělesné hmotnosti za hodinu, kterou může pacient dostat předepsaným způsobem bez nevhodných účinků (tabulka 2.6.14-1).

Předpokládejme ke zkoušení roztok obsahující *c* mg (nebo mezinárodních jednotek) přípravku v mililitru. Potom objem *M/c* ml je objem obsahující maximální dávku *M*. Jestliže tento objem obsahuje *K* mezinárodních jednotek endotoxinu, bude výsledek zkoušky pozitivní.

Proto limitní koncentrace endotoxinu (ELC) v mezinárodních jednotkách endotoxinu na mililitr, jež je shodná s prahovou koncentrací endotoxinu v miligramu nebo v mezinárodní jednotce přípravku v pevném stavu, je rovna:

$$ELC = \frac{K \cdot c}{M} .$$

K - nejvyšší přijatelná dávka endotoxinu v mezinárodních jednotkách na kilogram hmotnosti za hodinu,

c - koncentrace roztoku v miligramech nebo mezinárodních jednotkách přípravku na mililitr,

M - maximální dávka přípravku v miligramech nebo mezinárodních jednotkách na kilogram hmotnosti za hodinu.

U přípravků, které jsou již v tekuté formě, se vyjádří maximální dávka pro dospělého na kilogram hmotnosti za hodinu v mililitrech. Výše uvedené vyjádření maximální limitní koncentrace endotoxinu platí též pro přípravky, u nichž je uvedena maximální dávka v mililitrech na kilogram hmotnosti za hodinu nahrazením *M* a *c* hodnotou jedna.

Prahová koncentrace endotoxinu byla v minulosti definována jako maximální limitní koncentrace endotoxinu (MAEC). Avšak prakticky přípravek obsahující množství endotoxinu, které se rovná přesně MAEC, by nevyhověl zkoušce stejně jako přípravek obsahující endotoxinu více. Jediný způsob, jak se přesvědčit, že MAEC v přípravku nebyla překročena, je prokázat, že koncentrace endotoxinu v přípravku je nižší než MAEC; takže je mnohem logičtější používat termín limitní koncentrace endotoxinu (ELC) jako koncentraci endotoxinu, která nesmí být dosažena.

Limitní koncentrace endotoxinu závisí na druhu přípravku a jeho použití a je uvedena v jednotlivých článcích, do nichž je třeba nahlédnout. Hodnoty *K* jsou uvedeny v tabulce 2.6.14-1.

Tab. 2.6.14-1

Zamýšlený způsob podání	*K* v mezinárodních jednotkách endotoxinu na kilogram tělesné hmotnosti za hodinu
intravenózní	5,0
intravenózní pro radiofarmaka	2,5
intratékální	0,2

Hodnota ELC ve výluhu jednorázových pomůcek nebo zdravotnických prostředků určených k implantaci závisí nejen na hodnotě *K* a *M*, ale též na přípravě výluhu. Pro patřičnou informaci je třeba prohlédnout specifický článek.

Které ředění přípravku se má použít ve zkoušce, aby byla naprostá jistota, že negativní výsledek zkoušky znamená, že koncentrace endotoxinu v přípravku je nižší než ELC a že pozitivní výsledek znamená, že lyzát detekoval alespoň ELC? Toto ředění závisí na ELC a na citlivosti lyzátu: označuje se jako maximální platné ředění (MVD) a tato hodnota se může vypočítat ze vzorce.

$$MVD = \frac{ELC}{\lambda} = \frac{K \,.\, c}{M \,.\, \lambda},$$

v němž značí:

λ - uvedenou citlivost lyzátu v mezinárodních jednotách endotoxinu na mililitr.

Jestliže hodnota maximálního platného ředění není celým číslem, pak je možno pro rutinní účel zvolit odpovídající celé číslo nižší, než je MVD (čímž je míněna hodnota ředění roztoku přípravku nižší, než je udaná hodnota MVD). V tomto případě negativní výsledek zkoušky ukazuje, že koncentrace endotoxinu v přípravku se nachází pod hladinou limitní hodnoty. Je-li však koncentrace endotoxinu v přípravku v takovéto zkoušce nižší než ELC, ale dostatečně vysoká k tomu, aby při reakci s lyzátem došlo k tvorbě gelu, může být zkouška hodnocena za těchto podmínek jako pozitivní. Tudíž, je-li zkouška s tímto "vhodným" ředicím faktorem pozitivní, je nutno přípravek ředit na MVD a zkoušku opakovat. V jakémkoli případě pochybností nebo sporu musí být použito MVD.

To zdůrazňuje důležitost potvrzení citlivosti lyzátu.

Příklad

Zkouší se roztok sodné soli fenytoinu obsahující 50 mg/ml (zamýšlený pro intravenózní podání). Stanoví se MVD za použití následujících proměnných:

M - maximální lidská dávka = 15 mg na kilogram hmotnosti za hodinu,

c - 50 mg/ml,

K - množství endotoxinu na kilogram za hodinu v mezinárodních jednotkách,
λ - 0,4 m.j. endotoxinu na mililitr.

Řešení:

$$ELC = \frac{K \cdot c}{M} = \frac{5 \cdot 50}{15}$$

$$MVD = \frac{ELC}{\lambda} = \frac{5 \cdot 50}{15} \cdot \frac{1}{0,4} = 41,67$$

Pro rutinní zkoušení tohoto přípravku je vhodné ředit 1 ml roztoku ke zkoušce na 20 ml (MVD/2 zaokrouhleno na nejbližší menší celé číslo). Je-li však zkouška pozitivní, bude analytik muset ředit 1 ml na 41,67 ml a opakovat zkoušku. Ředění na 41,67 ml je rovněž nutné, jestliže se zkoušením má vyřešit sporný výsledek.

3. Referenční materiál

Referenční přípravek endotoxinu BRP je určen pro použití jako porovnávací přípravek. Byl přezkoušen proti mezinárodnímu standardu endotoxinu a jeho účinnost je vyjádřena v mezinárodních jednotkách endotoxinu v mililitru. Mezinárodní jednotka endotoxinu je definována jako specifická účinnost obsažená v definovaném množství mezinárodního standardu.

Pro rutinní účely je možno použít jiný přípravek endotoxinu, jestliže byl přezkoušen proti mezinárodnímu standardu endotoxinu nebo endotoxinu BRP, a jeho účinnost je vyjádřena v mezinárodních jednotkách endotoxinu.

Jedna ampule referenčního přípravku obvykle obsahuje větší množství, než je množství potřebné pro jednu zkoušku, a analytik potřebuje vědět, jak dlouho lze obsah otevřené ampule používat. Pokles účinnosti nebyl pozorován v ampulích, které byly otevřeny v laminárním boxu, uzavřeny vhodným materiálem a dva týdny skladovány při +4 °C. Analytik samozřejmě musí určit účinnost takovéto ampule při rutinním laboratorním režimu, je-li odkázán na prodloužené používání otevřené ampule.

4. Voda pro LAL

Zkoušení na nepřítomnost endotoxinu v této látce zkouškou na pyrogenní látky na králíku bylo vyloučeno z praktických a teoretických důvodů:

- králík není dostatečně citlivý, aby mohl detekovat endotoxin ve vodě pro LAL, určené ke zkoušení přípravků s velice nízkou limitní koncentrací endotoxinu;
- relativně nízká přesnost teplotní odpovědi u králíka vede k opakování na mnoha králících;
- termíny "pyrogenní látky" a "endotoxiny" označují skupiny látek, které nejsou zcela totožné.

Text zkoušky na bakteriální endotoxin ukazuje, že i jiná metoda, než je trojnásobná destilace, se může použít k přípravě vody LAL. Reverzní osmóza byla použita s dobrým výsledkem; někteří analytici mohou dávat přednost vodě destilované více než třikrát. V každém případě použitá metoda musí zaručit, že výsledný produkt je prost zjistitelného endotoxinu.

5. Hodnota pH směsi

Ve zkoušce na bakteriální endotoxin dochází ke vzniku gelu nejvhodněji při pH 6,0 až 7,5. Při přidání lyzátu ke vzorku může však dojít k poklesu pH. Proto, aby byla jistota, že pH směsi není nižší než 6,0, má se analytik přesvědčit o tom, že hodnota pH zkoušeného vzorku není nižší než 6,5.

6. Validace lyzátu pro použití v limitní gelové metodě

Při přípravě roztoku lyzátu je důležité se řídit návodem výrobce.

Pozitivní ředicí faktory se převedou na logaritmy. Důvodem toho graficky znázorněné rozložení četnosti těchto logaritmických hodnot dává obvykle normální distribuční křivku mnohem vyrovnanější, než je distribuční rozložení ředicích faktorů jako takových; v podstatě jde o tak podobné hodnoty, že je přijatelné použít normální frekvenční distribuci jako matematický model a stanovit interval spolehlivosti Studentovým *t*-testem.

7. Předběžná zkouška na interferující faktory

Některé přípravky nelze přímo zkoušet na přítomnost endotoxinu, protože je nelze smíchat se zkoumadly, nelze u nich upravit hodnotu pH v rozmezí 6,5 až 7,5 nebo inhibují nebo aktivují tvorbu gelu. Proto je nutno provést předběžnou zkoušku na zjištění přítomnosti interferujících faktorů: jsou-li nalezeny, pak analytik prokáže, že postup použitý k jejich odstranění byl dostatečně účinný.

Předmětem předběžného zkoušení je nulová hypotéza, že citlivost lyzátu v přítomnosti zkoušeného přípravku se signifikantně neliší od citlivosti lyzátu bez přítomnosti vzorku. Jednoduché kritérium je použito v obecné metodě: nulovou hypotézu lze přijmout, jestliže citlivost lyzátu v přítomnosti zkoušeného vzorku je nejméně polovina a nejvýše dvojnásobek citlivosti lyzátu samotného.

Klasickým způsobem se stanoví průměrné hodnoty logaritmů ředicích faktorů lyzátu pro citlivost s přípravkem a bez něho a vypočítá se rozdíl mezi oběma průměrnými hodnotami Studentovým *t*-testem.

8. Odstranění interferujících faktorů

Postup k odstranění interference nesmí ani zvyšovat ani snižovat množství endotoxinu ve zkoušeném přípravku (např. nesmí dojít ke snížení vlivem adsorpce). Správný způsob jak toto ověřit je, že se do zkoušky zařadí vzorek přípravku, ke kterému se přidá známé množství endotoxinu, a poté se měří zpětně koncentrace endotoxinu.

Ukazálo se, že v mnoha případech je dostatečně účinná ultrafiltrace přípravku na asymetrických membránových celuloso-triacetátových filtrech. Filtry mají být patřičně validovány, protože v některých případech mohou deriváty celulosy (β-D-glykany) způsobovat falešně pozitivní výsledky.

Polysulfonové filtry, uvedené v dřívějším textu, byly shledány nevhodnými, protože někteří uživatelé při jejich použití získali falešně pozitivní výsledky.

9. Poslání kontrol

Účelem kontroly vody pro LAL a referenčního přípravku endotoxinu ve dvojnásobné koncentraci, než je vyznačená citlivost lyzátu, je ověřit aktuální citlivost lyzátu v podmínkách zkoušky. Účelem negativní kontroly je ověřit nepřítomnost měřitelné koncentrace endotoxinu ve vodě pro LAL.

Druhá pozitivní kontrola, která obsahuje zkoušený přípravek v koncentraci použité ve zkoušce, je zařazena proto, aby byla prokázána nepřítomnost interferujících faktorů v průběhu a v podmínkách prováděné zkoušky.

10. Hodnocení a interpretace výsledků

Jak je uvedeno v úvodním odstavci textu, zkouška s lyzátem z amébocytů se používá jako limitní test a stanovení limitu závisí na popsaných faktorech. Nepatrné množství endotoxinu ve vodě pro LAL nebo v některém jiném zkoumadle nebo materiálu, jemuž je vystaven lyzát při zkoušce, nemusí být zjištěno, pokud nedosáhne limitu citlivosti lyzátu. Může však zvyšovat množství endotoxinu v roztoku se zkoušeným přípravkem právě na hranici hodnoty citlivosti lyzátu a způsobovat pozitivní reakci.

Riziko tohoto případu lze snížit přezkoušením vody pro LAL a ostatních zkoumadel a materiálů s co nejcitlivějším lyzátem, který je dostupný, nebo s takovým, který je mnohem citlivější, než je lyzát použitý pro zkoušený přípravek. Ani takto nelze zcela vyloučit riziko falešně pozitivního výsledku. Tento postup by měl být zařazen, aby byla zajištěna bezpečná interpretace výsledků oproti případu falešně negativního testu, který může vést k propuštění nevyhovujícího přípravku ohrožujícího zdraví pacienta.

11. Náhrada zkoušky na pyrogenní látky na králících předepsané v lékopisném článku

O použití zkoušky s lyzátem z amébocytů lze uvažovat i u lékopisného přípravku, pro který je předepsána zkouška na pyrogenní látky na králících. Obecné stanovisko k použití alternativní metody namísto lékopisné je uvedeno v Obecných zásadách (*1.2*).

"Popsané zkoušky na čistotu a stanovení jsou oficiální metody, na nichž je založena standardnost lékopisu. Se souhlasem příslušné autority lze při kontrole použít alternativní analytické metody za předpokladu, že užitými metodami se dosáhne shodného výsledku jako s ustanoveními v článku, jestliže by byla použita oficiální metoda. V případě pochybnosti nebo sporného výsledku je lékopisná metoda jako jediná rozhodující".

Jako směrnice jsou doporučeny následující postupy:

11.1 Postupy, materiály a zkoumadla používané ve zkoušce s lyzátem z amébocytů mají být validovány, jak je popsáno ve zkoušce na bakteriální endotoxiny.

11.2 Přítomnost interferujících faktorů (a je-li to třeba, postupy k jejich odstranění) se prověří na vzorkách nejméně ze tří výrobních šarží.

11.3 Jestliže jsou dostupné vzorky z výrobní šarže, které ve zkoušce na pyrogenní látky na králících byly pozitivní, měly by se také přezkoušet na bakteriální endotoxiny. Nejsou-li tyto vzorky dostupné, pak je rozhodující zkouška na pyrogenní látky a zkouška na bakteriální endotoxiny je zbytečná.

12. Validace zkoušky pro nové přípravky

Postup uvedený v části 11.1 a 11.2 se použije u všech nových přípravků pro parenterální podání, které se mají zkoušet na přítomnost bakteriálních endotoxinů podle požadavků lékopisu.

13. Nové přípravky ovlivňující tělní teplotu

Jestliže se u nového přípravku během jeho vývoje ukáže, že by mohl ovlivňovat tělní teplotu, je možno použít zkoušku na bakteriální endotoxiny k důkazu jejich nepřítomnosti. V tomto případě se postupuje, jak je uvedeno v části 11.1 a 11.2. Avšak jsou-li patrny známky kontaminace přípravku neendotoxinovými pyrogenními látkami, je nutno získat podklady z mnohem rozsáhlejšího zkoušení.

14. Kvantitativní stanovení endotoxinů

Stávající text zkoušky na bakteriální endotoxiny se zabývá podmínkami pro limitní zkoušku s tvorbou gelu jako krajním bodem. Kvantitativní stanovení endotoxinu založené na vzniku zákalu nebo na štěpení chromogenního peptidu komplexem endotoxin-lyzát jsou již dnes dostupná i pro rutinní zkoušení. Rozeznávají se čtyři metody na kvantitativní stanovení:

1. *Zákalová* metoda stanovení v konečném bodě: zákal ve vzorku se měří po dosažení vrcholu;
2. *Kinetická zákalová* metoda: měří se rychlost vývoje zákalu;
3. *Chromogenní peptidová* metoda stanovení v konečném bodě: komplex endotoxin-lyzát štěpí chromogenní peptid a koncentrace uvolněného barviva se měří jako indikátor koncentrace endotoxinu;
4. *Kinetická chromogenní peptidová* metoda: měří se rychlost vzniku zbarvení po rozštěpení chromogenního peptidu a to je indikátorem koncentrace endotoxinu.

Obě metody stanovení v konečném bodě se obvykle provádějí s koncentrací lyzátu, která je ve srovnání s koncentrací endotoxinu vyšší. Jako výsledek lze považovat odpověď, která vyjadřuje koncentraci endotoxinu jako lineární funkci s tím, že tato koncentrace nepřesáhne horní limit. Odpovídajícím matematickým modelem je model poměru sklonů.

V obou kinetických metodách je možno logaritmus reakčního času považovat za lineární funkci logaritmu koncentrace endotoxinu. Proto je v tomto případě odpovídajícím matematickým modelem model rovnoběžnosti.

Nyní je limitní gelový test na bakteriální endotoxin oficiální metodou lékopisu. Pracovník, který hodlá použít některou ze čtyř výše uvedených kvantitativních metod, prokáže, že tato alternativní metoda splní požadavky uvedené v úvodu všeobecné části (viz část 11, "Náhrada zkoušky na pyrogenní látky na králících předepsané v lékopisném článku).

Nejprve je nutno prokázat, že metoda splňuje požadavky pro lineární regresi:
- dostatečný sklon,
- nevýznamné odchylky od lineárního průběhu.

Pro metodu stanovení v konečném bodě je ještě požadavek, aby se rozdíly mezi naměřenými hodnotami blížily nule.

Dodatek Statistické analýzy výsledků biologických zkoušek (*5.3*) obsahuje informace o statistických postupech, jež se mají použít na tyto zkoušky.

Je nepravděpodobné, že by přesnost kterékoli z kvantitativních metod byla nižší, než je limit pro gelovou zkoušku. Předešlá směrnice FDA "Draft guideline on the validation of the Limulus amoebocyte lysate test" určuje horní limit 0,3654 v dekadickém logaritmu pro standardní odchylku pro limitní koncentraci v gelovém testu. Pokud reziduální chyba kvantitativní metody tento limit nepřekročí, je nepravděpodobné, že přesnost bude nedostatečná.

Může nastat pět druhů situací, ve kterých má analytik prokázat platnost kvantitativní metody:
1. vzrůst teploty způsobený novým přípravkem při jeho vývoji;
2. průkaz, že použitá zkoumadla a materiály neobsahují endotoxin;
3. průkaz, že zkoušený přípravek neinterferuje se zkouškou na bakteriální endotoxiny nebo, jestliže interferuje, že kroky použité k odstranění interference jsou dostatečné;
4. validace citlivosti metody;
5. rutinní zkoušení šarží přípravku po předchozích typech zkoušky bylo ukončeno jako uspokojivé.

V prvním případě je postup popsaný v části 12 "Validace zkoušky pro nové přípravky" a 13 "Nové přípravky ovlivňující tělní teplotu" přijatelný. Avšak, jestliže byl limit pro nový přípravek validován v gelovém limitním testu, pak je nepravděpodobné, že kvantitativní metodou by bylo dosaženo jiného závěru.

V situacích 2 a 3 je nutno pamatovat na to, že obě metody používající chromogenní peptid vyžadují zkoumadla, která se nepoužívají v gelové limitní zkoušce, a tudíž vyhovuje-li limitní gelová zkouška požadavkům, nelze to vztáhnout na chromogenní peptidovou metodu bez dalšího přezkoušení. Navrhuje se provést zkoušku na interferenci nejméně na třech výrobních šaržích zkoušeného přípravku.

V situaci 4 se doporučuje, aby analytik ověřil citlivost metody s metodou, kterou hodlá použít, a to obzvlášť v případě, použije-li lyzát, který nebyl přesně vyvinut pro stejný typ kvantitativní zkoušky.

Vsituaci 5 se jedná o podobný případ uvedený v části 12"Validace zkoušky pro nové přípravky".

2.6.15 Aktivátor prekalikreinu

Podstata zkoušky. Aktivátor prekalikreinu aktivuje štěpení prekalikreinu na kalikrein. Štěpí též chromofor ze syntetického polypeptidického substrátu a rychlost štěpení je měřitelná spektrofotometricky. Koncentrace zkoušeného přípravku se vypočítá porovnáním s referenčním přípravkem kalibrovaným v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v určitém množství mezinárodního standardu, který pozůstává z lyofilizovaného aktivátoru prekalikreinu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Příprava substrátu prekalikreinu. Krev nebo plazma pro přípravu prekalikreinu může přijít do styku pouze s plastem nebo sklem, jehož povrch je silikonovaný, čímž se zabrání aktivaci srážení.

Devět objemových dílů lidské krve se smíchá s 1 objemovým dílem antikoagulačního roztoku (ACD, CPD nebo roztoku *citronanu sodného R*, 38 g/l), do kterého se přidá 1 mg *hexadimethriniumdibromidu R* na 1 ml. Po odstředění směsi při 3600 g_n po dobu 5 min se oddělí plazma a znovu se 20 min odstřeďuje při 6000 g_n, aby sedimentovaly destičky. Po oddělení se plazma chudá na destičky 20 h dialyzuje proti desetinásobnému objemu tlumivého roztoku A. Dialyzovaná plazma se nanese na chromatografickou kolonu obsahující *agarosu-DEAE pro výměnnou iontovou chromatografii R*. Agarosa se nejprve uvede do rovnováhy s tlumivým roztokem A. Objem nabobtnalého gelu je dvakrát větší než objem plazmy. Eluce z kolony tlumivým roztokem A probíhá rychlostí 20 ml/cm^2/h. Eluát se shromažďuje do frakcí a zaznamenává se jejich absorbance při 280 nm (*2.2.25*). Spojují se a zachycují frakce, které obsahují bílkovinu zobrazenou na záznamu jako první pík. Jejich objem je asi 1,2krát větší než objem plazmy chudé na destičky.

Spojený objem substrátu se zkouší na nepřítomnost aktivity kalikreinu tak, že se 1 objemový díl smíchá s 20 objemovými díly předehřátého roztoku chromogenního substrátu, jenž se použije při stanovení, a směs se inkubuje 2 min při 37 °C. Substrát je vhodný, jestliže vzrůst absorbance za minutu je menší než 0,001. Ke spojenému objemu substrátu se přidá *chlorid sodný R* (7 g/l) a filtruje se membránovým filtrem (o velikosti porů 0,45 μm). Filtrát se rozdělí na části, které se dají zmrznout, a uchovávají při -25 °C. Substrát se může též lyofilizovat.

Postup od začátku chromatografie po zmrazení v rozdělených částech se provede v průběhu jednoho pracovního dne.

Postup zkoušky. Stanovení je výhodné provádět na automatickém enzymovém analyzátoru při 37 °C a nastavit objemy, koncentrace substrátů a inkubační doby tak, aby rychlost reakce probíhala lineárně alespoň do 35 m.j./ml. Porovnávací roztoky, zkoušené roztoky a substrát prekalikreinu se, je-li to nutné, mohou ředit tlumivým roztokem B.

Zředěné porovnávací roztoky nebo zkoušené roztoky se 10 min inkubují se substrátem prekalikreinu. Je nutné, aby objem nezředěného vzorku nebyl vyšší než 1/10 celkového objemu inkubační směsi. Tím se vyloučí chyby způsobené změnami iontové síly a pH inkubační směsi. Směs nebo její část se inkubuje s nejméně stejným objemem roztoku vhodného syntetického chromogenního substrátu, o kterém je známo, že je specifický pro kalikrein (např. *N-benzoyl-L-prolyl-L-fenylalanyl--L-arginyl-(4-nitrofenyl)amoniumacetat R* nebo *D-prolyl-L-fenylalanyl-L-arginin-4-nitroanilid dihyd-rochloridu R*), rozpuštěného v tlumivém roztoku B. Zapisuje se rychlost změny absorbance za minutu po dobu 2 min až 10 min při vlnové délce specifické pro použitý substrát. Pro každou směs zkoušeného nebo referenčního přípravku se připraví kontrolní tekutina, která místo substrátu prekalikreinu obsahuje tlumivý roztok B.

Zjištěné změny absorbance za minutu se korigují odečtením odpovídající změny absorbance za minutu u kontrolní tekutiny. Pro referenční přípravek se vynese kalibrační křivka, která zobrazuje

závislost korigovaných výsledků změny absorbance za minutu na koncentracích. Tato křivka se použije pro stanovení účinnosti prekalikreinového aktivátoru ve zkoušeném vzorku.

Tlumivý roztok A

trometamol R	6,055 g
chlorid sodný R	1,17 g
hexadimethriniumdibromid R	50 mg
azid sodný R	0,100 g

Chemikálie se rozpustí ve *vodě R*, pH roztoku se upraví *kyselinou chlorovodíkovou 2 mol/l RS* na 8,0 a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

Tlumivý roztok B

trometamol R	6,055 g
chlorid sodný R	8,77 g

Chemikálie se rozpustí ve *vodě R*, pH roztoku se upraví *kyselinou chlorovodíkovou 2 mol/l RS* na 8,0 a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

2.6.16 Důkaz cizích antigenů v humánních virových vakcínách

Pokud tyto zkoušky vyžadují nejprve neutralizaci viru, použijí se specifické protilátky, které nejsou humánního ani opičího původu: jestliže byl virus pomnožen na tkáni ptačího původu, nemohou to být ani protilátky ptačího původu. K přípravě antiséra se užívá imunizační antigen připravený na buněčné kultuře z odlišného druhu, než je kultura užívaná pro přípravu vakcíny, a prosté cizích agens. Jestliže je předepsáno použití SPF vajec, tato vejce odpovídají požadavkům předepsaným ve stati Chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů, která jsou určena pro výrobu a kontrolu jakosti očkovacích látek (5.2.2).

Virové inokulum

Vzorky inokula se odeberou při sklizni, a jestliže se ihned nezkoušejí, uchovávají se při teplotě nižší než -40 °C.

Dospělé myši. Každé z nejméně deseti dospělých myší o hmotnosti 15 g až 20 g se vstříkne intracerebrálně 0,03 ml a intraperitoneálně 0,5 ml inokulačního viru. Myši se pozorují nejméně 21 dní. U všech myší uhynulých po prvních 24 h, nebo které mají příznaky nemoci, se provede pitva, aby se odhalily známky infekčního onemocnění. Postupuje se jednak makroskopickým pozorováním, jednak přeočkováním vhodné tkáňové suspenze intracerebrálně a intraperitoneálně nejméně dalším pěti dospělým myším, které se pozorují 21 dní. Inokulační virus vyhovuje, jestliže žádná myš nevykazuje známky infekce, jež by se mohly přičíst inokulačnímu viru. Zkoušku lze hodnotit, jestliže dobu pozorování přežije nejméně 80 % původně inokulovaných myší.

Sající myši. Každé z nejméně dvaceti myší mladších než 24 h se vstříkne intracerebrálně 0,01 ml a intraperitoneálně 0,1 ml inokulačního viru. Myši se pozorují denně nejméně 14 dní. U všech myší uhynulých po prvních 24 h, nebo které mají příznaky nemoci, se provede pitva, aby se odhalily známky infekčního onemocnění. Postupuje se jednak makroskopickým pozorováním, jednak přeočkováním vhodné tkáňové suspenze intracerebrálně a intraperitoneálně nejméně dalším pěti sajícím myším, které se denně pozorují 14 dní. Inokulační virus vyhovuje, jestliže žádná sající myš nevykazuje známky infekce, jež by se mohly přičíst inokulačnímu viru. Zkoušku lze hodnotit, jestliže dobu pozorování přežije nejméně 80 % původně inokulovaných sajících myší.

Morčata. Nejméně pěti morčatům o hmotnosti 350 g až 450 g se vstříkne intraperitoneálně po 5 ml inokulačního viru. Zvířata se sledují nejméně 42 dní, aby se odhalily všechny příznaky nemoci. U všech zvířat, která po prvních 24 h uhynou nebo která mají příznaky nemoci, se provede pitva s makroskopickým vyšetřením; tkáně se vyšetří mikroskopicky a kultivačně na přítomnost infekce. Zvířata, která přežila dobu pozorování, se usmrtí a vyšetří se stejným způsobem. Inokulační virus vyhovuje, jestliže žádné morče nevykazuje známky infekce, jež by se mohly přičíst inokulačnímu viru. Zkoušku lze hodnotit, jestliže dobu pozorování přežije nejméně 80 % původně inokulovaných morčat.

Inokulační virus a virus sklizený

Vzorky se odeberou při sklizni, a jestliže se ihned nezkoušejí, uchovají se při teplotě nižší než -40 °C.

Bakteriální a houbová sterilita. 10 ml vzorku vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Mykoplazmata (2.6.7). 10 ml vzorku vyhovuje zkoušce na mykoplazmata; pokud nebyl při výrobě použit substrát ptačího původu, provede se pouze zkouška na neaviární mykoplazmata a ureaplazmata.

Mykobakterie (2.6.2). 5 ml vzorku se zkouší na přítomnost *Mycobacterium* spp. kultivačními metodami uznanými za citlivé pro detekci těchto organismů.

Zkoušky na jiná cizí agens na tkáňových kulturách. Množství vzorku, jestliže není předepsáno jinak, které odpovídá 500 lidských dávek nebo 50 ml vakcíny, podle toho, co je více, se zkouší na přítomnost cizích agens naočkováním do kultur buněk kontinuální linie opičí ledviny a lidských buněk. Jestliže virus rostl na lidských diploidních buňkách, neutralizovaný sklizený virus se také zkouší na oddělené kultuře diploidních buněk. Jestliže byl vakcinační virus pomnožován v buněčném systému jiném než lidském nebo opičím, naočkují se také buňky tohoto druhu z oddělené kultury. Tyto buňky se kultivují při (36 ± 1) °C a prohlížejí se 14 dní. Inokulační virus nebo sklizený virus vyhovují, jestliže žádná z buněčných kultur nevykazuje známky přítomnosti jakéhokoli cizího agens, jež nelze přičíst náhodné kontaminaci. Zkoušku lze hodnotit, jestliže přežívá nejméně 80 % buněčných kultur.

Ptačí viry (pouze pro viry pomnožené na tkáni ptačího původu). Neutralizuje se množství vzorku odpovídající buď 100 lidským dávkám, nebo 10 ml, podle toho, co je více. Na jedno kuřecí embryo se použije 0,5 ml, inokuluje se skupina oplozených SPF vajec, 9 až 11 dní starých, alantoidní cestou a druhá skupina, 5 až 7 dní starých, do žloutkového vaku. Inkubuje se 7 dní. Inokulační virus nebo sklizený virus vyhovují, jestliže alantoidní tekutiny ani tekutiny žloutkového vaku nevykazují přítomnost hemaglutinačního agens a jestliže všechna embrya a chorioalantoidní membrány, makroskopicky vyšetřené, jsou normální. Zkoušku lze hodnotit, jestliže nejméně 80 % embryí přežije 7 dní.

Kultura produkčních buněk: kontrolní buňky

Aby se ověřila nepřítomnost virů způsobujících cytopatickou degeneraci, posuzují se kontrolní buňky mikroskopicky buď po celou dobu inkubace, nebo 14 dní od naočkování výrobních nádob, podle toho, která doba je delší. Zkoušku lze hodnotit, jestliže pozorovací období přežije nejméně 80 % kontrolních kultur.

Po 14 dnech nebo v čase poslední sklizně, podle toho, které období je delší, se provedou níže popsané zkoušky.

Zkouška na hemadsorbující viry. Nejméně 25 % kontrolních kultur se zkouší na přítomnost hemadsorbujících virů přidáním morčecích červených krvinek.Jestliže jsou morčecí krvinky sklado-

vány, uchovávají se nejdéle 7 dní při (5 ± 3) °C . Polovina kultur se odečítá po 30 min inkubace při (5 ± 3) °C, druhá polovina po 30 min inkubace při 20 °C až 25 °C. Nezjistí se přítomnost hemadsorbujících agens.

Zkouška na jiná cizí agens v tkáňových kulturách. Směs supernatantních tekutin z kontrolních buněk se zkouší na přítomnost cizích agens naočkováním do kultur buněk opičí ledviny a lidských buněk. Jestliže byl vakcinační virus pomnožován v buněčném systému jiném než lidském nebo opičím, naočkují se také buňky tohoto druhu, ale z oddělené kultury. V každém buněčném systému se zkouší nejméně 5 ml. Naočkované kultury se inkubují při (36 ± 1) °C a pozorují se 14 dní. Nezjistí se přítomnost cizího agens.

Viry ptačí leukózy (pouze pro viry pomnožené na tkáni ptačího původu). Zkouška na viry ptačí leukózy se provede s 5 ml supernatantní tekutiny z kontrolních buněk.

Kontrolní vejce

Hemaglutinační agens. 0,25 ml alantoidní tekutiny z každého vejce se zkouší na přítomnost hemaglutinačního agens přímým smísením s kuřecími červenými krvinkami a po pasáži na SPF vejcích se postupuje takto: 5 ml vzorku ze směsi amniových tekutin z kontrolních vajec se naočkuje po 0,5 ml do alantoidních dutin a do amniových dutin SPF vajec. Kontrolní vejce vyhovují, jestliže v následujících dvou zkouškách nejsou nalezeny známky přítomnosti hemaglutinačních agens.

Viry ptačí leukózy. Použije se 10 ml směsné amniové tekutiny z kontrolních vajec. Provede se rozhojnění pěti pasážemi na buněčných kulturách z kuřecích embryí, které prokazatelně neobsahují viry ptačí leukózy; zkouška na přítomnost ptačí leukózy se provede použitím buněk z páté pasáže. Kontrolní vejce vyhovují, jestliže se zkouškou neprokážou žádné známky přítomnosti viru ptačí leukózy.

Ostatní cizorodá agens. 5 ml směsné amniotické tekutiny z kontrolních vajec se naočkuje do lidských a opičích buněčných kultur. Buněčné kultury se sledují 14 dní. Kontrolní vejce vyhovují, jestliže není nalezena přítomnost cizích agens. Zkoušku lze hodnotit, jestliže dobu pozorování přežije nejméně 80 % naočkovaných kultur.

2.6.17 Zkouška antikomplementární účinnosti imunoglobulinu

Podstata zkoušky. Pro měření antikomplementární účinnosti (ACA) imunoglobulinu se inkubuje definované množství zkoušeného materiálu (10 mg imunoglobulinu) s definovaným množstvím morčecího komplementu, které je 20 CH_{50}, a stanoví se zbývající komplement. Antikomplementární účinnost je vyjádřena jako procenta spotřeby komplementu vzhledem ke kontrole komplementu, která je 100 %.

Hemolytická jednotka účinnosti komplementu (CH_{50}) je množství komplementu, které za daných podmínek reakce způsobí lýzu 2,5 . 10^8 z celkových 5 . 10^8 optimálně senzibilizovaných erytrocytů.

Zásobní roztok hořčíku a vápníku. 1,103 g *chloridu vápenatého R* a 5,083 g *chloridu hořečnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Zásobní tlumivý roztok barbitalový. 207,5 g *chloridu sodného R* a 25,48 g *barbitalu sodné soli R* se rozpustí ve 4000 ml *vody R* a upraví se hodnota pH *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 7,3. Přidá se 12,5 ml zásobního roztoku hořčíku a vápníku a zředí se *vodou R* na 5000 ml. Zfiltruje se membránovým filtrem (póry velikosti 0,22 μm) a uchovává se ve skleněných nádobách při 4 °C.

Roztok želatiny. 12,5 g *želatiny R* se rozpustí v asi 800 ml *vody R* a zahřeje se na vodní lázni k varu. Ochladí se na 20 °C a zředí *vodou R* na 10 l. Filtruje se membránovým fitrem (póry velikosti 0,22 μm). Uchovává se při 4 °C. Používá se jen čirý roztok.
Citronanový roztok. 8,0 g *citronanu sodného R*, 4,2 g *chloridu sodného R* a 20,5 g *glukosy R* se rozpustí v 750 ml *vody R*. Roztokem *kyseliny citronové R* (100 g/l) se upraví hodnota pH na 6,1 a zředí se *vodou R* na 1000 ml.
Tlumivý roztok želatino-barbitalový. Smíchají se 4 objemové díly roztoku želatiny a 1 objemový díl zásobního tlumivého roztoku barbitalového. Je-li to nutné, upraví se *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* nebo *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* pH na hodnotu 7,3. Uchovává se při 4 °C. Denně se připravuje čerstvý roztok.
Stabilizovaná beraní krev. Odebere se 1 objemový díl beraní krve do 1 objemového dílu citronanového roztoku a promíchá se. Uchovává se při 4 °C nejméně 7 dní a nejvýše 28 dní. (Stabilizovaná beraní krev a beraní erytrocyty jsou dostupné od řady výrobců).
Hemolyzin. Antisérum proti beraním erytrocytům připravené na králících. (Taková antiséra jsou dostupná od řady výrobců.)
Morčecí komplement. Připraví se směs sér z krve alespoň deseti morčat. Ze sražené krve se sérum oddělí odstřeďováním při asi 4 °C. Sérum se uchovává v malých objemech při teplotě nižší než -70 °C.

Metoda

Příprava standardizované 5% suspenze beraních erytrocytů. Erytrocyty se odstřeďováním oddělí z přiměřeného objemu stabilizované beraní krve; buňky se nejméně třikrát promyjí tlumivým roztokem želatino-barbitalovým a připraví se 5% suspenze (*V/V*) v tomto roztoku. Měření koncentrace buněk v suspenzi se provádí takto: 0,2 ml se převede do 2,8 ml *vody R* a lyzovaný roztok se odstřeďuje 5 min při 1000 g_n. Koncentrace buněk vyhovuje, jestliže absorbance (*2.2.25*) vrchní vrstvy měřená při 541 nm je 0,62 ± 0,01. Úprava koncentrace buněk se provádí přidáním tlumivého roztoku želatino-barbitalového podle vzorce:

$$V_f = \frac{V_i \cdot A}{0{,}62},$$

v němž značí:
V_f - konečný připravovaný objem,
V_i - počáteční objem,
A - absorbanci původní suspenze při 541 nm.

Upravená suspenze obsahuje asi 1 x 10^9 buněk v 1 ml.

Titrace hemolyzinu. Schéma přípravy ředění hemolyzinu je uvedeno v tabulce 2.6.17-1.

Do každé zkumavky, počínaje ředěním 1 : 75, se dá 1 ml 5% suspenze beraních erytrocytů a promíchá se. Inkubuje se 30 min při 37 °C. Z každé zkumavky takto inkubované směsi se odeberou 0,2 ml do nové zkumavky, přidá se 1,10 ml tlumivého roztoku želatino-barbitalového a 0,2 ml ředěného morčecího komplementu (např. 1 : 150). Provádí se dvojmo.

Jako nehemolyzovaná buněčná kontrola se připraví tři zkumavky s 1,4 ml tlumivého roztoku želatino-barbitalového a 0,1 ml 5% suspenze beraních erytrocytů.

Jako plně hemolyzovaná buněčná kontrola se připraví tři zkumavky s 1,4 ml *vody R* a 0,1 ml 5% suspenze beraních erytrocytů.

Tab. 2.6.17-1

Požadované ředění hemolyzinu	Připraveno za použití		
	tlumivý roztok želatino-barbitalový	hemolyzin	
	objem (ml)	ředění 1 :	objem (ml)
7,5	0,65	neředěno	0,1
10	0,90	neředěno	0,1
75	1,80	7,5	0,2
100	1,80	10	0,2
150	1,00	75	1,0
200	1,00	100	1,0
300	1,00	150	1,0
400	1,00	200	1,0
600	1,00	300	1,0
800	1,00	400	1,0
1200	1,00	600	1,0
1600	1,00	800	1,0
2400	1,00	1200	1,0
3200*	1,00	1600	1,0
4800*	1,00	2400	1,0

* Odstraní se 1 ml směsi.

Všechny zkumavky se inkubují 60 min při 37 °C a odstřeďují se 5 min při 1000 g_n. Změří se absorbance (*2.2.25*) vrchních vrstev při 541 nm a vypočítá se stupeň hemolýzy v každé zkumavce v procentech ze vzorce:

$$\frac{A_a - A_1}{A_b - A_1} \cdot 100 ,$$

v němž značí:
A_a - absorbanci zkumavek s ředěným hemolyzinem,
A_b - průměr absorbancí tří zkumavek s plnou hemolýzou,
A_1 - průměr absorbancí tří zkumavek bez hemolýzy.

Sestrojí se lineární graf: na ordinátu se nanese procentuální stupeň hemolýzy, na abscisu odpovídající převrácená hodnota ředění hemolyzinu. Z grafu se určí optimální ředění hemolyzinu. Vybere se to ředění, kde již další vzestup obsahu hemolyzinu nezpůsobuje patrné změny ve stupni hemolýzy. Toto ředění je 1 minimální hemolytická jednotka (1 MHU) v 1,0 ml. Optimální hemolytické ředění hemolyzinu pro přípravu senzibilizovaných beraních erytrocytů obsahuje 2 MHU v mililitru.

Titrace hemolyzinu není hodnotitelná, jestliže maximum hemolýzy není mezi 50 % a 70 %. Není-li maximum v tomto rozmezí, je nutno titraci opakovat s více nebo méně ředěným roztokem komplementu.

Příprava optimálně senzibilizovaných beraních erytrocytů (hemolytický systém). Připraví se vhodný objem ředěného hemolyzinu, který obsahuje 2 MHU v mililitru a stejný objem standardizované 5% suspenze beraních erytrocytů. Ke standardizované buněčné suspenzi se přidá ředěný hemolyzin a smíchá se.Inkubuje se 15min při 37 °C,uchovává se při 2 °C až 8 °C a použije se do 6 h.

Titrace komplementu. Připraví se vhodné ředění komplementu (např. 1 : 250) tlumivým roztokem želatino-barbitalovým a provede se dvojmo titrace podle tabulky 2.6.17-2.

Tab. 2.6.17-2

Číslo zkumavky	Objem ředěného komplementu v ml (např. 1 : 250)	Objem tlumivého roztoku želatino-barbitalového v ml
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1
3 zkumavky s 0% hemolýzy	-	1,3
3 zkumavky se 100% hemolýzou	-	1,3 ml vody

Do každé zkumavky se přidá 0,2 ml senzibilizovaných beraních erytrocytů, dobře se promíchá a inkubuje se 60 min při 37 °C. Zkumavky se potom ochladí v ledové lázni a odstřeďují se 5 min při 1000 *g*. Změří se absorbance vrchní vrstvy při 541 nm a vypočítá se stupeň hemolýzy (Y) ze vzorce:

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1},$$

v němž značí:
A_c - absorbanci zkumavek 1 až 12,
A_b - průměr absorbancí zkumavek se 100% hemolýzou,
A_1 - průměr absorbancí buněčných kontrol s 0% hemolýzou.

Na logaritmický papír se vynese $Y/(1 - Y)$ jako abscisa proti obsahu ředěného komplementu v mililitru jako ordináta. Body se co nejlépe proloží křivka a určí se ordináta pro 50% hemolytickou dávku komplementu, kde $Y/(1 - Y) = 1{,}0$. Vypočítá se účinnost v hemolytických jednotkách (CH_{50}/ml) ze vzorce:

$$\frac{C_d}{C_a \cdot 5},$$

v němž značí:
C_d - převrácenou hodnotu ředění komplementu,
C_a - objem ředěného komplementu, kde došlo k 50% hemolýze, v mililitrech,
5 - přepočítací faktor v souvislosti s počtem erytrocytů.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže křivka mezi 15 % a 85 % hemolýzy je přímkou, jejíž sklon je 0,15 až 0,40, přednostně 0,18 až 0,30.

Zkouška antikomplementární účinnosti. Připraví se ředění komplementu o 100 CH_{50}/ml ředěním vytitrovaného morčecího komplementu tlumivým roztokem želatino-barbitalovým. Je-li to nutné, upraví se pH zkoušeného imunoglobulinu na 7. Pro imunoglobulin o obsahu 50 mg/ml se připraví směs k inkubaci takto:

Tab. 2.6.17-3

	Zkoušený imunoglobulin	Kontrola komplementu (dvojmo)
imunoglobulin (50 mg/ml) tlumivý roztok želatino-barbitalový komplement	0,2 ml 0,6 ml 0,2 ml	- 0,8 ml 0,2 ml

Současně se zkoušeným přípravkem se provede zkouška s lidským imunoglobulinem *BRP*, jak je doporučeno v původním letáku referenčního přípravku pro negativní a pozitivní kontrolu antikomplementární účinnosti. Jestliže koncentrace zkoušeného imunoglobulinu kolísá kolem 50 mg/ml, přidá se větší nebo menší objem vzorku a tlumivého roztoku želatino-barbitalového, např. 0,47 ml tlumivého roztoku želatino-barbitalového je přidáno k 0,33 ml imunoglobulinu o obsahu 30 mg/ml -do objemu 0,8 ml. Zkumavky se uzavřou a inkubují se 60 min při 37 °C. 0,2 ml z každé inkubované směsi se přidá k 9,8 ml tlumivého roztoku želatino-barbitalového, aby se zředil komplement. Provede se titrace komplementu v každé zkumavce tak, jak je popsáno výše, aby se určila zbytková účinnost komplementu (viz tabulka 2.6.17-2). Antikomplementární účinnost zkoušeného přípravku ve vztahu ke kontrole komplementu, která je uvažována jako 100%, se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{a - b}{a} \cdot 100 ,$$

v němž značí:
a - průměr účinnosti kontrolního komplementu (CH_{50}/ml),
b - účinnost komplementu (CH_{50}/ml) zkoušeného přípravku.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže jsou splněny následující podmínky:
- antikomplementární účinnost nalezená pro negativní a pozitivní kontrolu je v limitech stanovených v průvodním letáku referenčního přípravku,
- účinnost u kontroly komplementu (*a*) je v rozmezí 80 CH_{50} až 120 CH_{50} v mililitru.

2.6.18 Zkouška neurovirulence živých virových vakcín

Podstata zkoušky. Neurovirulence se zjišťuje naočkováním zkoušeného přípravku opicím a jejich sledováním.

Postup zkoušky. Pro každou zkoušku se použije nejméně deset opic séronegativních na zkoušený virus. Každé opici se vstříkne nejvýše 0,5 ml zkoušeného přípravku do talamické oblasti každé hemisféry, pokud není uvedeno jinak.

Celkové množství viru podaného každé opici není nižší než množství obsažené v jedné doporučené lidské dávce vakcíny. Jako kontrola proti zavlečení divokého neurovirulentního viru je chována skupina nejméně 4 kontrolních opic v druhé části klece nebo v bezprostředním sousedství naočkovaných zvířat. Očkované opice se pozorují 17 dní až 21 dní, sledují se příznaky ochrnutí nebo jiné známky neurologického poškození; kontrolní opice jsou sledovány stejně dlouhou dobu a navíc

ještě 10 dní. Zvířata, která uhynou do 48 h po injekci, se vyřadí jako úhyn z nespecifických příčin a mohou být nahrazena.

Zkouška není platná, jestliže více než 20 % inokulovaných zvířat uhyne z nespecifických příčin nebo jestliže ve vzorcích séra odebraných od kontrolních opic v době očkování zkoušených zvířat a také 10 dní po usmrcení zkoušených zvířat je prokázána infekce divokým virem typu zkoušeného viru nebo viru spalniček. Na závěr pozorování se provede pitva a histopatologické vyšetření odpovídajících oblastí mozku, jež by prokázalo poškození centrálního nervového systému. Zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže zvířata nevykazují žádné neočekávané klinické příznaky nebo histopatologické důkazy poškození centrálního nervového systému, které by bylo možno přisuzovat inokulovanému viru.

2.6.19 Zkouška neurovirulence vakcíny proti obrně (per os)

Opice použité v této zkoušce vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Vaccinum poliomyelitidis perorale* a váží nejméně 1,5 kg. Patogenita se stanoví u opic rodu *Macaca* nebo *Cercopithecus* v porovnání s referenčním virem připraveným pro zkoušku neurovirulence inokulací do bederní oblasti centrálního nervového systému po předchozím podání vhodného sedativa, např. ketaminiumchloridu. Vzorky séra odebrané před injekcí prokazatelně neobsahují neutralizační protilátky v ředění 1 : 4 při zkoušení proti nejvýše 1000 $CCID_{50}$ každého ze tří typů polioviru.

Počet opic. Vakcína a vhodný homotypický referenční virus se zkouší současně v téže skupině opic. Stejnému počtu zvířat se vstříkne zkoušená vakcína a referenční přípravek. Zvířata se rozdělí náhodně do ošetřovacích skupin a klecí a jejich totožnost se kóduje při očkování. Zařazení jednotlivých zvířat se před ošetřovatelem a pitvajícím tají. Počet naočkovaných opic je takový, aby při vyhodnocení zkoušené vakcíny a referenčního přípravku bylo nejméně jedenáct pozitivních opic u typů 1 a 2 a nejméně osmnáct pozitivních opic u typu 3 (pozitivní opice jsou takové, které v centrálním nervovém systému mají specifické poliovirové léze neuronu). S týmž homotypickým referenčním přípravkem může být zkoušena více než jedna šarže vakcíny. Je-li to možné, použijí se opice z téže karanténní skupiny. V opačném případě se použijí opice ze dvou skupin a stejná množství z každé skupiny se použijí pro podání vakcíny a referenčního přípravku. Jestliže se zkouška provádí ve dvou pracovních dnech, naočkuje se stejné množství opic z každé skupiny v týž den vakcínou a homotypickým referenčním přípravkem.

Obsah viru. Obsahy viru ve vakcíně a homotypickém referenčním přípravku se upraví tak, aby byly titry pokud možno stejné a v rozmezí od $10^{5,5}$ do $10^{6,5}$ $CCID_{50}$/0,1 ml.

Pozorování. Všechny opice se pozorují 17 až 22 dní, aby se zjistily příznaky poliomyelitidy nebo jiné virové infekce. Opice, které přežijí prvních 24 h, ale uhynou před jedenáctým dnem po očkování, se pitvají, aby se určilo, zda byla poliomyelitida příčinou smrti. Zvířata, která uhynula z jiných příčin, než je poliomyelitida, se vyloučí z hodnocení. Umírající nebo těžce paralyzovaná zvířata se usmrtí a pitvají. Všechna zvířata, která přežijí do konce pozorovacího období, se též pitvají. Zkouška není platná, jestliže více než 20 % zvířat vykazuje během pozorovacího období interkurentní infekci.

Počet vyšetřovaných řezů. Z každé opice se histologicky vyšetří nejméně bederní mícha, krční mícha a nižší i vyšší část prodloužené míchy, střední mozek, talamus a motorická oblast kůry mozkové. Zkoumají se řezy tenčí než 15 μm a barvené gallocyaninem.

Nejnižší počet vyšetřovaných řezů je následující:
a) 12 řezů reprezentujících celou bederní ztluštěninu,
b) 10 řezů reprezentujících celou krční ztluštěninu,
c) 2 řezy z prodloužené míchy,
d) 1 řez z mostu a mozečku,
e) 1 řez ze středního mozku,
f) 1 řez z levé a pravé části thalamu,
g) 1 řez z levé a pravé části motorické oblasti mozkové kůry.

Určení aktivity viru. Pro hodnocení virové aktivity v řezech ze hřbetní míchy a mozkového kmene se používá hodnotící systém pro stupeň poškození, který rozlišuje buněčnou infiltraci a destrukci neuronů následovně:
1. pouze buněčná infiltrace (tyto opice se nepovažují za pozitivní),
2. buněčná infiltrace s minimálním poškozením neuronu,
3. buněčná infiltrace s rozsáhlým poškozením neuronu,
4. masivní poškození neuronu s buněčnou infiltrací nebo bez ní.

Výsledky se zaznamenávají do standardního formuláře. [7)]Opice s neuronálními lézemi v řezech, které ale nevykazují stopy po vpichu, jsou počítány jako pozitivní. Opice vykazující stopy po vpichu v řezech, ale nikoli neuronální léze nejsou počítány jako pozitivní. Řezy, které vykazují traumatické poškození, ale nemají žádné specifické virové léze, se nezahrnují do počtu.

Závažnost nálezu je založena na odečtení výsledků z bederních (L), krčních (C) a mozkových (B) histologických řezů.

Ohodnocení lézí (LS) pro každou pozitivní opici se vypočítá takto:

$$LS = \left\{ \left[\frac{\text{součet hodnot } L}{\text{počet řezů}} \right] + \left[\frac{\text{součet hodnot } C}{\text{počet řezů}} \right] + \left[\frac{\text{součet hodnot } B}{\text{počet řezů}} \right] \right\} : 3 \ .$$

Pro každou skupinu pozitivních opic se vypočítá průměrný počet lézí.

Hodnocení. Srovnání virové aktivity ve vakcíně a referenčním přípravku je založeno na aktivitě v bederním ztluštění míchy a stupni šíření aktivity z této oblasti do krčního ztluštění a mozku. Vhodnost nebo nevhodnost je založena na celkovém poměru u všech zvířat ve zkoušce. Jednotlivá zvířata vykazující neobvykle vysokou aktivitu jak v bederní oblasti, tak i v důsledku šíření z této oblasti jsou také zavzata do konečného hodnocení. Monovalentní várka vyhovuje ve zkoušce, jestliže je požadovaný počet zvířat pozitivní a žádné z histopatologických a klinických vyšetření nevykazuje významný rozdíl v patogenitě mezi vakcinačním virem a referenčním přípravkem. Podmínky vhodnosti jsou uvedeny níže.

Požadavky. S každou referenční vakcínou (typ 1, 2 a 3) se provede vhodný počet neurovirulenčních kvalifikačních zkoušek (např. čtyři zkoušky) a získaná data o její aktivitě slouží jako základ pro požadavky na zkoušenou vakcínu. Celkový průměrný počet lézí (M) pro opakované zkoušky každého referenčního viru se hodnotí společně se shromážděnými výsledky v testu (s^2) jako odhad směrodatné odchylky (s).

Požadavky na platnost výsledků ve zkoušce referenčního přípravku jsou stanoveny na základě kumulativních dat z kvalifikačních zkoušek. Nejsou stanoveny všeobecně platné podmínky; pro pomoc zkoušejícím laboratořím jsou doporučeny následující empirické metody pro získání přijatelných limitů průměrného počtu lézí pro referenční přípravek (X_{ref}).

[7)] Vhodný formulář uvádějí Požadavky na perorální vakcínu proti poliomyelitidě (Requirements for Biological Substances No. 7, World Health Organisation) vydané Světovou zdravotnickou organizací.

Tab. 2.6.19-1

	Spodní limit	Horní limit
Typy 1 a 2	$M - s$	$M + s$
Typ 3	$M - s/2$	$M + s$

Jestliže je průměrný počet lézí ve vakcíně stanoven X_{test} a C_1, C_2 a C_3 jsou konstanty stanovené postupem uvedeným níže, pak vakcína nevyhovuje, jestliže:

$$X_{test} - X_{ref} > C_1 .$$

Vakcína se může zkoušet znovu, jestliže:

$$C_1 < X_{test} - X_{ref} < C_2 .$$

Při opakovaném zkoušení vakcíny se přepočítává průměrný počet lézí ve zkoušené vakcíně a v referenčním přípravku. Přípravek nevyhovuje, jestliže:

$$\frac{X_{(test\ 1\ +\ test\ 2)} - X_{(ref\ 1\ +\ ref\ 2)}}{2} > C_3 .$$

Konstanty C_1, C_2 a C_3 se vypočítají ze vzorců:

$$C_1 = 2{,}3 \cdot \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}} ,$$

$$C_2 = 2{,}6 \cdot \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}} ,$$

$$C_3 = 1{,}6 \cdot \sqrt{\frac{2s^2}{N_2}} ,$$

v nichž značí:
N_1 - počet pozitivních opic ve zkoušce vakcíny,
N_2 - počet pozitivních opic ve dvou zkouškách,
2,3 - normální odchylku na 1% hladině,
2,6 - normální odchylku na 0,5% hladině,
1,6 - normální odchylku na 5% hladině.

Zkoušku neurovirulence, v které průměrný počet lézí pro referenční přípravek (X_{ref}) není shodný s údaji z předešlých pokusů, nelze použít pro určení vhodnosti vakcíny. Jestliže je zkouška vakcíny platná, průměrný počet lézí pro zkoušenou vakcínu (X_{test}) lze počítat a srovnávat s homotypickou referenční vakcínou.

2.6.20 Hemaglutininy anti-A a anti-B (nepřímá metoda)

Připraví se dvě stejné řady postupně ředěného zkoušeného přípravku roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l). Ke každému ředění první řady se přidá stejný objem 5% (*V/V*) suspenze erytrocytů krevní skupiny A_1 předem třikrát promytých v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Ke každému ředění druhé řady se přidá stejný objem 5% (*V/V*) suspenze erytrocytů skupiny B předem třikrát promytých v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Tyto suspenze se inkubují 30 min při 37 °C a pak se erytrocyty třikrát promyjí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Erytrocyty se ponechají 30 min v kontaktu s polyvalentním sérem proti lidským globulinům. Bez dalšího odstředění se mikrosko-

2.7 Metody stanovení účinnosti

2.7.1 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na selektivní, reverzibilní a nekovalentní vazbě antigenů s protilátkami. Tyto metody se používají k důkazu nebo ke stanovení antigenů nebo protilátek. Vznik komplexu antigen-protilátka lze dokázat a množství vytvořeného komplexu lze stanovit různými metodami. Ustanovení tohoto obecného článku se vztahují na imunochemické metody používající podle potřeby buď značená nebo neznačená zkoumadla.

Výsledky imunochemických metod závisí na experimentálních podmínkách a povaze a kvalitě použitých zkoumadel. Proto je nezbytné standardizovat složky imunochemických stanovení a použít k tomu, pokud to je možné, mezinárodní referenční přípravky pro ně určené.

Zkoumadla potřebná pro mnoho imunochemických metod jsou dostupná jako komerční zkušební soupravy, to jsou sady obsahující zkoumadla (zvláště antigen nebo protilátku) a látky určené ke stanovení specifikované substance in vitro, včetně návodu na jejich správné použití. Soupravy se používají podle návodu výrobce. Je důležité ověřit, zda soupravy jsou vhodné pro analýzu zkoušené látky, se zvláštním zřetelem na jejich selektivitu a citlivost. Přehled o soupravách pro imunochemická stanovení připravila Světová zdravotnická organizace (Technical Report Series 658; 1981).

Metody používající značený antigen nebo značenou protilátku

Metody používající značené látky mohou využívat vhodná značení, jako jsou enzymy, fluorofory, luminofory a radioizotopy. Je-li ke značení použit radioizotop, metoda se nazývá "radioimunoanalýza". Doporučení pro měření radioaktivity uvedená v článku *Radiofarmaca* lze použít při imunologických stanoveních spojených s radioizotopy. Veškerá práce s radioaktivním materiálem se provádí ve shodě s národním zákonodárstvím a mezinárodně přijatými pravidly o ochraně před radioaktivním zářením.

Metody používající neznačený antigen nebo neznačenou protilátku

Imunoprecipitační metody

Imunoprecipitační metody zahrnují flokulaci a precipitační reakce. Je-li roztok antigenu smíchán za vhodných podmínek s odpovídající protilátkou, reagující složky vytvoří flokulační nebo precipitační agregáty. Poměr reagujících složek, při němž je doba flokulace nejkratší nebo precipitace nejvýraznější, se nazývá optimální poměr a je obvykle tvořen ekvivalentními množstvími antigenu a protilátky. Imunoprecipitace může být stanovena vizuálně nebo metodami rozptylu světla (nefelometrické nebo turbidimetrické stanovení). Použitím částic (např. latex) pokrytých antigenem nebo protilátkou se může dosáhnout zvýšení citlivosti.

Ve flokulačních metodách se obvykle používá postupné ředění jedné z reagujících složek, zatímco v imunodifuzních metodách (ID) se ředění dosahuje difuzí do prostředí gelu: získají se koncentrační gradienty jedné nebo obou reagujících složek a v prostředí gelu se tak vytvoří zóny, kde poměr složek podporuje precipitaci. Zatímco flokulační metody se provádějí ve zkumavkách, v metodách imunodifuze se používají různé pomůcky, jako jsou zkumavky, destičky, sklíčka nebo komůrky.

Je-li imunoprecipitační systém složen z jednoho antigenu, který se váže na odpovídající protilátku, označuje se jako *systém jednoduchý*. Zahrnuje-li příbuzné, ale sérologicky neidentické reagující

složky, je to *systém komplexní*, a obsahuje-li několik sérologicky nepříbuzných složek, je to *systém složený*.

V *jednoduchých difuzních metodách* se koncentrační gradient ustaví pouze pro jednu z reagujících složek, která difunduje z vnějšího zdroje do prostředí gelu obsahujícího odpovídající druhou složku v relativně nízké koncentraci.

Jednoduchá radiální imunodifuze (SRID) je jednoduchá kvantitativní imunodifuzní technika. Když je dosaženo rovnováhy mezi vnější a vnitřní reagující složkou, vytvářejí se kruhové precipitační plochy kolem bodu s vnější složkou. Plochy jsou přímo úměrné koncentraci antigenu v gelu a nepřímo úměrné koncentraci protilátky v gelu.

V *metodách dvojité difuze* se koncentrační gradienty ustavují pro obě reagující složky. Antigen i protilátka difundují z oddělených míst do původně imunologicky neutrálního gelu.

Komparativní metody dvojité imunodifuze se používají pro kvalitativní porovnávání různých antigenů reakcí s vhodnou protilátkou a naopak. Srovnávání je založeno na přítomnosti nebo nepřítomnosti vzájemného působení mezi precipitačními liniemi. Mohou být rozlišeny reakce totožnosti, rozdílnosti nebo částečné totožnosti mezi antigeny nebo protilátkami.

Imunoelektroforetické metody

Imunoelektroforéza (IE) je kvalitativní technika spojující dvě metody: gelovou elektroforézu s následnou imunodifuzí.

Dvojrozměrná imunoelektroforéza je modifikace imunoelektroforetické metody. Je vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzy. První část postupu je normální gelová elektroforéza, po které jsou z gelu vyříznuty podélné pásky obsahující rozdělené určované frakce a jsou přeneseny na jinou desku. Elektroforéza ve druhém směru se provádí v úhlu 90° k předcházející elektroforéze v gelu, který obsahuje poměrně nízkou koncentraci protilátek odpovídajících antigenům. Pro danou koncentraci protilátky a tloušťku gelu je lineární vztah mezi plochou příslušných precipitačních píků a množstvím odpovídajícího antigenu.

Elektroimunoanalýza, často označovaná jako *raketková imunoelektroforéza*, je rychlá kvantitativní metoda pro stanovení antigenů s nábojem odlišným od náboje protilátek nebo naopak. Elektroforéza stanovovaného antigenu se provádí v gelu, který obsahuje poměrně nízkou koncentraci odpovídající protilátky. Zkoušený materiál a roztoky standardního antigenu použité pro kalibraci jsou naneseny do odlišných jamek v gelu. V průběhu elektroforézy se vytvářejí pohyblivé precipitační zóny ve tvaru píků (raketek), které začínají u jamek. Čelo precipitátu se zastaví, není-li již antigen v přebytku. Pro danou koncentraci protilátky platí lineární vztah mezi výškou píku (raketky) precipitátu a množstvím použitého antigenu.

Protisměrná imunoelektroforéza je rychlá kvantitativní metoda, která umožňuje, aby se v elektrickém poli ustavil koncentrační gradient vnějšího antigenu a vnější protilátky v závislosti na odlišných nábojích. Naředěné roztoky standardů pro kalibraci a ředění zkoušené látky se nanesou do řady jamek v gelu a stálé množství odpovídající reagující složky je naneseno do protilehlé řady jamek. Titr zkoušené látky může být určen jako nejvyšší ředění, při kterém se tvoří precipitační linie.

Existuje mnoho modifikací dvourozměrné a raketkové imunoelektroforézy.

Jiné techniky spojují dělení antigenů podle velikosti molekuly a sérologických vlastností.

Zviditelnění a charakterizace imunoprecipitačních linií

Může se provádět selektivním nebo neselektivním barvením, fluorescencí, značením enzymy nebo izotopy nebo jinou vhodnou technikou. Metody selektivního barvení se obvykle používají pro charakterizaci nebílkovinných látek v precipitátech.

V průsvitných gelech, jako jsou gely agaru nebo agarosy, jsou precipitační linie v gelu jasně viditelné, pokud je vhodná koncentrace reagujících složek.

Validace metod

Validační požadavky

Kvantitativní imunochemická metoda je platná, jestliže:

1. protilátka nebo antigen nerozlišuje signifikantně mezi zkouškou a standardem. V případě značených reagujících složek odpovídající složka nerozlišuje signifikantně mezi značenou a neznačenou látkou;
2. metoda není ovlivněna zkoušenou matricí, to je žádnou složkou zkoušeného vzorku nebo jeho pomocnými látkami, které se mohou u vzorků lišit. V tom mohou být zahrnuty vysoké koncentrace jiných bílkovin, solí a konzervačních látek *nebo kontaminující proteolytické aktivity*;
3. limit kvantitativního vyjádření je nižší než přijatá kritéria uvedená v jednotlivém článku;
4. přesnost metody je taková, že odchylky výsledků vyhovují požadavkům uvedeným v jednotlivých článcích;
5. při postupu v provedení zkoušky nevznikají systematické chyby.

Validační metody

Ke splnění těchto požadavků validační plán obsahuje následující prvky:

1. stanovení se provede nejméně třikrát,
2. stanovení se provede nejméně se třemi různými ředěními standardu a třemi ředěními vzorku, které mají předpokládanou podobnou účinnost jako ředění standardu,
3. plán stanovení má náhodné uspořádání,
4. je-li zkoušená látka předložena ve formě séra nebo smíchána s dalšími látkami, je standard rovněž připraven stejným způsobem,
5. zkouška zahrnuje měření nespecifické vazby značené reagující složky,
6. pro vytěsňovací imunologické stanovení:
   a) je určena maximální vazba (nulové vytěsnění),
   b) ředění zasahují úplnou reakční řadu od hodnot blízkých nespecifické vazbě až po maximální vazbu, přednostně jak pro standard, tak pro zkoušené přípravky.

Statistické výpočty

K vyhodnocení výsledků mohou být analyzovány reakční křivky pro vzorek a standard metodami popsanými ve stati Statistické hodnocení výsledků biologických zkoušek (*5.3*).

Signifikantní nerovnoběžnost ukazuje, že protilátka nebo antigen rozlišují mezi vzorkem a standardem a výsledky nejsou platné.

Ve vytěsňovacích imunologických stanoveních nesmí být hodnoty nespecifické vazby a maximálního vytěsnění při vysokých koncentracích vzorku nebo standardu signifikantně rozdílné. Rozdíly mohou ukazovat na vliv matrice, která způsobí buď inhibici vazby nebo degradaci značení.

2.7.2 Mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik

Účinnost antibiotika se stanoví porovnáním inhibice růstu citlivých mikroorganismů vyvolané známými koncentracemi zkoušeného antibiotika a referenční látky.

Referenční látky použité ke stanovení jsou ty, jejichž účinnost byla přesně stanovena v poměru k odpovídajícímu mezinárodnímu standardu nebo mezinárodnímu referenčnímu přípravku.

Plán stanovení je takový, aby dovolil ověřit validitu matematického modelu, na němž je založeno porovnání účinnosti. Je-li vybrán model rovnoběžných přímek, dvě logaritmické přímky dávky a odpovědi (nebo transformované odpovědi) zkoušeného přípravku a referenčního přípravku jsou rovnoběžné a jsou lineární v intervalu dávek použitých k výpočtu. Tyto podmínky se validují pro danou hladinu pravděpodobnosti, obvykle $P = 0{,}05$. Jiné matematické modely, jako model např. regresního poměru, mohou být též použity, je-li prokázána validita zkoušky.

Pokud není v článku uvedeno jinak, je interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovení nejméně 95 % a nejvýše 105 % stanovené účinnosti. Stanovení se provádí metodou A nebo metodou B.

A. Difuzní metoda

Živná půda vhodná pro stanovení (viz níže) se rozehřeje a při vhodné teplotě, např. 48 °C až 50 °C pro vegetativní formy, se naočkuje suspenzí mikroorganismů citlivých na zkoušené antibiotikum v takovém množství, které vytváří zřetelně ohraničené inhibiční zóny o průměru přiměřeném koncentraci zkoušeného antibiotika. Naočkovaná půda se ihned vylije do Petriho misek nebo velkých pravoúhlých misek (ploten) v takovém množství, aby se vytvořila jednolitá vrstva silná 2 mm až 5 mm. Živná půda může být též vylita ve dvou vrstvách, z nichž jenom vrchní je naočkována. Takto připravené misky se uchovávají tak, aby před použitím nedošlo k viditelnému růstu mikroorganismů nebo k jejich usmrcení a aby povrch půd byl v čase použití suchý.

Pro přípravu roztoků stejných koncentrací zkoušeného přípravku a referenční látky se použijí rozpouštědla a tlumivé roztoky uvedené v tabulce 2.7.2-1. Roztoky se nanesou buď na povrch půdy, např. do sterilních cylindříků z porcelánu, z nerezavějící oceli, případně z jiných vhodných materiálů, nebo do otvorů vyříznutých v živné půdě. Objem roztoků v každém cylindříku nebo otvoru musí být stejný. Lze též použít sterilní disky z absorbujícího papíru vhodné kvality, které se před položením na půdu napustí roztoky referenční látky nebo zkoušeného antibiotika.

K ověření platnosti stanovení se použijí nejméně tři rozdílné dávky referenční látky a tři odpovídající dávky zkoušeného antibiotika. Doporučuje se používat geometrickou řadu dávek. Při běžných zkouškách účinnosti, u nichž je prokázán lineární průběh systému na přiměřeném počtu třídávkových stanovení a u nichž s tím souhlasí oprávněná autorita, nebo může postačovat i dvoudávkové stanovení; ve všech sporných případech se však použije metoda třídávková referenční látky a rovněž tři dávky zkoušeného antibiotika o předpokládané stejné účinnosti jako dávky referenční látky.

Do každé Petriho misky nebo pravoúhlé misky se nanesou roztoky podle statisticky vhodného plánu. V případě malých misek, které nepojmou více než šest roztoků, se doporučuje měnit umístění roztoku zkoušeného antibiotika a referenční látky, aby se zabránilo interakcím koncentrovanějších roztoků.

Inkubuje se při vhodné teplotě asi 18 h. Doba předinkubační difuze, obvykle 1 h až 4 h, při pokojové teplotě nebo 4 °C, může být vhodná k potlačení účinku časových rozdílů mezi aplikací roztoků a tak zlepšit regresi.

Změří se průměry kruhových inhibičních zón s přesností nejméně 0,1 mm nebo jejich plochy s odpovídající přesností. Pomocí vhodných statistických metod se vypočítá účinnost zkoušeného antibiotika.

V každé zkoušce se použije pro každou dávku tolik inhibičních zón, aby byla zajištěna požadovaná přesnost. Stanovení účinnosti může být opakováno a výsledky mohou být statisticky sloučeny, aby se dosáhlo požadované přesnosti stanovení a ověřilo se, že účinnost antibiotika není menší než požadované minimum.

Tab. 2.7.2-1 Difuzní metoda

Antibiotikum	Referenční látka	Rozpouštědlo k přípravě základního roztoku	Tlumivý roztok (pH)	Mikroorganismus	Půda a konečné pH (± 0,1)	Inkubační teplota ve °C
Bacitracinum zincicum	*Bacitracinum zincicum CRL*	*kyselina chlorovodíková 0,01 mol/l VS*	pH 7,0 (0,05 mol/l)	*Micrococcus flavus* NCTC 7743 CIP 53.160 ATCC 10240 CCM 732 CNCTC M 8/58	A - pH 7,0	35 až 39
Bleomycini sulfas	*Bleomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 6,8 (0,1 mol/l)	*Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 CCM 4622 CNCTC My 23/64	G - pH 7,0	35 až 37
Colistini sulfas	*Colistini sulfas CRL*			*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 CCM 4416 CNCTC Brb 5/63	B - pH 7,3	35 až 39
Colistimethatum natricum	*Colistimethatum natricum CRL*	*voda R*	pH 6,0 (0,05 mol/l)	*Escherichia coli* NCIB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536 CCM 3988 CNCTC Ec 326/71	B - pH 7,3	35 až 39
Dihydrostreptomycini sulfas	*Dihydrostreptomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus subtilis* NCTC 8236 CIP 1.83 CCM 2217 CNCTC Bs 17/65	A - pH 7,9	30 až 37
				Bacillus subtilis NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 7,9	30 až 37
Erythromycini estolas Erythromycini ethylsuccinas Erythromycini stearas	*Erythromycinum CRL*	*methanol R* viz články	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18 CCM 2218 CNCTC Bac 2/65	A - pH 7,9	30 až 37
		methanol R		*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 7,9	30 až 37

Antibiotikum	Referenční látka	Rozpouštědlo k přípravě základního roztoku	Tlumivý roztok (pH)	Mikroorganismus	Půda a konečné pH (± 0,1)	Inkubační teplota ve °C
Framycetini sulfas	*Framycetini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	E - pH 7,9	30 až 37
				Bacillus pumilus NCTC 8241 CIP 76.18 CCM 2218 CNCTC Bac 2/65	E - pH 7,9	30 až 37
Gentamicini sulfas	*Gentamicini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18 CCM 2218 CNCTC Bac 2/65	A - pH 7,9	35 až 39
				Staphylococcus epidermidis NCIB 8853 CIP 68.21 ATCC 12228 CCM 4418 CNCTC M 12/63	A - pH 7,9	35 až 39
Kanamycini monosulfas Kanamycini sulfas acidus	*Kanamycini monosulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 7,9	30 až 37
				Staphylococcus aureus NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	A - pH 7,9	35 až 39
Neomycini sulfas	*Neomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18 CCM 2218 CNCTC Bac 2/65	E - pH 7,9	30 až 37
				Bacillus subtilis NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	E - pH 7,9	30 až 37

Antibiotikum	Referenční látka	Rozpouštědlo k přípravě základního roztoku	Tlumivý roztok (pH)	Mikroorganismus	Půda a konečné pH (± 0,1)	Inkubační teplota ve °C
Nystatinum	*Nystatinum CRL*	*dimethylformamid R*	pH 6,0 (0,05 ml/l) obsahující 5 % (*V/V*) dimethylformamidu R	*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 87 CIP 1432.83 ATCC 9763 CCM 8191 CNCTC 51/65	F - pH 6,0	30 až 32
Polymyxini B sulfas	*Polymyxini B sulfas CRL*	*voda R*	pH 6,0 (0,05 mol/l)	*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 CCM 4416 CNCTC Brb 5/63	B - pH 7,3	35 až 39
Rifamycinum natricum	*Rifamycinum natricum CRL*	*methanol R*	pH 7,0 (0,05 mol/l)	*Micrococcus flavus* NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341 CCM 552 CNCTC Sar 5/58	A - pH 6,6	35 až 39
Spiramycinum	*Spiramycinum CRL*	*methanol R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 7,9	30 až 32
Streptomycini sulfas	*Streptomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus subtilis* NCTC 8236 CIP 1.83 CCM 2217 CNCTC Bs 17/65 *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 7,9 A - pH 7,9	30 až 37 30 až 37
Tobramycinum	*Tobramycinum CRL*	*voda R*	pH 8,0 (0,05 mol/l)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 7,9	30 až 37
Vancomycini hydrochloridum	*Vancomycini hydrochloridum CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 CCM 1999 CNCTC Bs 8/58	A - pH 8,0	37 až 39

B. Turbidimetrická metoda

Vhodná živná půda se inokuluje suspenzí vybraného mikroorganismu, který je citlivý na zkoušené antibiotikum tak, aby v podmínkách zkoušky bylo dosaženo vhodného potlačení růstu mikrobiální kultury. Použije se známé množství suspenze vybrané tak, aby byl asi po čtyřhodinové inkubaci dobře měřitelný zákal.

Inokulovaná půda se musí použít ihned po naočkování.

Použije se rozpouštědlo a tlumivý roztok uvedený v tabulce 2.7.2-2 pro přípravu roztoků referenční látky a roztoků zkoušeného antibiotika ve známých koncentracích, u nichž se předpokládá stejná účinnost. K ověření platnosti stanovení se použijí nejméně tři dávky referenční látky a tři odpovídající dávky zkoušené látky. Doporučuje se použít geometrickou řadu dávek. K dosažení linearity je někdy nutné vybrat z většího počtu tří dávek za použití odpovídajících dávek referenční látky a zkoušené látky.

Použijí se stejné zkumavky. Do každé z nich se převede stejný objem roztoků a stejný objem naočkované živné půdy (např. 1 ml roztoku a 9 ml živné půdy).

Zároveň se připraví dvě kontrolní zkumavky bez antibiotika a s naočkovanou živnou půdou a do jedné se ihned přidá 0,5 ml *formaldehydu R*. Tyto zkumavky slouží ke standardizaci optického přístroje použitého k měření růstu.

Zkumavky se umístí buď náhodně, nebo podle latinského čtverce, nebo náhodného bloku do vodní lázně nebo jiného vhodného přístroje dovolujícího uvést rychle všechny zkumavky na uvedenou inkubační teplotu. Uchovávají se při této teplotě 3 h až 4 h a zabezpečí se stejná teplota a stejná doba inkubace.

Po inkubaci se zastaví ve všech zkumavkách růst mikroorganismů přidáním 0,5 ml *formaldehydu R* nebo zahřátím a změří se zákal s přesností na tři místa za použití vhodného optického přístroje. Alternativně lze použít jiný postup, který dovoluje měřit zákal každé zkumavky po stejné době inkubace.

Vypočítá se účinnost za pomoci vhodných statistických metod.

Linearita vztahu dávka-odpověď, transformovaná nebo netransformovaná, je často získána pouze ve velmi omezeném intervalu; je to ten interval, který se má použít pro výpočet účinnosti a obsahuje nejméně tři následné dávky dovolující ověřit linearitu. Při běžných zkouškách, pokud byla linearita systému prokázána na přiměřeném počtu třídávkových stanovení, postačí, pokud oprávněná autorita s tím souhlasí, použít k titraci jen dvě dávky. Ve všech sporných případech se však použije třídávková metoda.

V každé zkoušce se použije pro každou dávku tolik zkumavek, aby byla zajištěna požadovaná přesnost. Stanovení účinnosti může být opakováno a výsledky mohou být statisticky sloučeny, aby se dosáhlo požadované přesnosti stanovení a ověřilo se, že účinnost zkoušeného antibiotika není menší než požadované minimum.

Tab. 2.7.2-2 Turbidimetrická metoda

Antibiotikum	Referenční látka	Rozpouštědlo k přípravě základního roztoku	Tlumivý roztok (pH)	Mikroorganismus	Půda a konečné pH (± 0,1)	Inkubační teplota ve °C
Colistini sulfas Colistimethatum natricum	*Colistini sulfas CRL* *Colistimethatum natricum CRL*	*voda R*	pH 7,0	*Escherichia coli* NCIB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637 CCM 2024	C - pH 7,0	35 až 37
Dihydrostreptomycini sulfas	*Dihydrostreptomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031 CCM 4415 CNCTC Klp 85/69	C - pH 7,0	35 až 37
Erythromycini estolas Erythromycini ethylsuccinas Erythromycini stearas	*Erythromycinum CRL*	*methanol R* viz články	pH 8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031 CCM 4415 CNCTC Klp 85/69 *Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	D - pH 7,0 C - pH 7,0	35 až 37 35 až 37
Framycetini sulfas	*Framycetini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	35 až 37
Gentamicini sulfas	*Gentamicini sulfas CRL*	*voda R*	pH 7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	35 až 37

Antibiotikum	Referenční látka	Rozpouštědlo k přípravě základního roztoku	Tlumivý roztok (pH)	Mikroorganismus	Půda a konečné pH (± 0,1)	Inkubační teplota ve °C
Gramicidin	*Gramicidin CRL*	*methanol R*	pH 7,0[1)]	*Streptococcus faecalis* ATCC 10541 CCM 4533 CNCTC Str 6/58 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	35 až 37
Kanamycini monosulfas Kanamycini sulfas acidus	*Kanamycini monosulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	35 až 37
Neomycini sulfas	*Neomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	35 až 37
Rifamycinum natricum	*Rifamycinum natricum CRL*	*methanol R*	pH 7,0	*Escherichia coli* NICB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536 CCM 3988 CNCTC Ec 32-6/71	C - pH 7,0	35 až 37
Spiramycinum	*Spiramycinum CRL*	*methanol R*	pH 7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	35 až 37

[1)] K zamezení ztrát způsobených adsorpcí v průběhu ředění se může použít přísada detergentu, např. polysorbátu 80 v koncentraci 0,1 g/l.

Antibiotikum	Referenční látka	Rozpouštědlo k přípravě základního roztoku	Tlumivý roztok (pH)	Mikroorganismus	Půda a konečné pH (± 0,1)	Inkubační teplota ve °C
Streptomycini sulfas	*Streptomycini sulfas CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031 CCM 4415 CNCTC Klp 85/69	C - pH 7,0	35 až 37
Tobramycinum	*Tobramycinum CRL*	*voda R*	pH 7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58 NCTC 6571 CIP 53.154 ATCC 9144 CCM 2107 CNCTC Mau 76/69	C - pH 7,0	35 až 37
Vancomycini hydrochloridum	*Vancomycini hydrochloridum CRL*	*voda R*	pH 8,0	*Staphylococcus aureus* CIP 53.156 ATCC 6538P CCM 2022 CNCTC Mau 28/58	C - pH 7,0	37 až 39

Následující část se uvádí jako informace a rady; netvoří část, jež by byla v rozporu s obecnou metodou.

Doporučení pro mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik

Následující text uvádí doporučené mikroorganismy a podmínky zkoušky. Jiné mikroorganismy se mohou použít, pokud mají stejnou citlivost na zkoušené antibiotikum a jsou použity ve vhodné živné půdě a vhodných podmínkách teploty a pH. Výběr koncentrací roztoků musí zaručit, že v podmínkách zkoušky existuje lineární vztah mezi logaritmem dávky a odpovědí.

Příprava inokula

Bacillus cereus vac. *mycoides, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus.* Suspenze spor použitého mikroorganismu se připraví takto:

Mikroorganismy se kultivují 7 dní při 35 °C až 37 °C na vhodné pevné půdě, do které byl přidán *síran manganatý R* (1 mg/l). Nárůst, který obsahuje zejména spory, se spláchne sterilní *vodou R.* Suspenze se 30 min zahřívá na 70 °C a potom se zředí na přiměřenou koncentraci spor, obvykle $10 \cdot 10^6$ až $100 \cdot 10^6$ v ml. Suspenze spor se mohou uchovávat po dlouhou dobu při teplotě nepřevyšující 4 °C.

Alternativně se mohou suspenze spor připravit kultivací mikroorganismů v půdě C při 26 °C po dobu 4 až 6 dní. Potom se asepticky přidá dostatek *síranu manganatého R* do koncentrace 1 mg/l a inkubuje se dalších 48 h. V suspenzi se mikroskopicky zjistí, zda proběhla přiměřená tvorba spor (asi 80 %) a suspenze se odstředí. Sediment se resuspenduje ve sterilní *vodě R* tak, aby se dosáhla koncentrace spor v ml $10 \cdot 10^6$ až $100 \cdot 10^6$ a potom se zahřívá 30 min na 70 °C. Suspenze se uchovává při teplotě nepřevyšující 4 °C.

Bordetella bronchiseptica. Testovací mikroorganismus se kultivuje na půdě B 16 h až 18 h při 35 °C až 37 °C. Nárůst se smyje sterilní *vodou R* a zředí na vhodný zákal.

Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Micrococcus flavus, Staphylococcus epidermidis. Připraví se stejně, jak je popsáno v odstavci *Bordetella bronchiseptica*, ale použije se půda A a naředí se na takový zákal, který při turbidimetrickém stanovení poskytuje uspokojující vztah dávky k odpovědi nebo při difuzním stanovení vytváří zřetelně ohraničené inhibiční zóny postačujícího průměru.

Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis. Testovací mikroorganismus se kultivuje 24 h na půdě F při 30 °C až 37 °C. Nárůst se smyje sterilním roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) a zředí se jím na vhodný zákal.

Tlumivé roztoky

Tlumivé roztoky o pH v rozmezí 5,8 až 8,0 se připraví smícháním 50,0 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* s množstvím *hydroxidu sodného 0,2 mol/l VS* uvedeným v následující tabulce a doplněním čerstvě připravenou *vodou destilovanou R* na 200,0 ml.

Tab. 2.7.2-3

pH	Množství *hydroxidu sodného 0,2 mol/l VS* v ml
5,8	3,72
6,0	5,70
6,2	8,60
6,4	12,60
6,6	17,80
6,8	23,65
7,0	29,63
7,2	35,00
7,4	39,50
7,6	42,80
7,8	45,20
8,0	46,80

Tyto tlumivé roztoky se použijí pro všechny mikrobiologické zkoušky uvedené v tabulce 2.7.2-1 s výjimkou bleomyciniumsulfatu, pro který se tlumivý roztok o pH 6,8 připraví takto: rozpustí se 6,4 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 18,9 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* ve *vodě R* a zředí se na 1000,0 ml.

Živné půdy

Mohou se použít následující půdy nebo půdy jim rovnocenné.

Půda A

pepton	6 g
pankreatický hydrolyzát kaseinu	4 g
hovězí výtažek	1,5 g
kvasničný výtažek	3 g
glukosa monohydrát	1 g
agar	15 g
voda	do 1000 ml

Půda B

pankreatický hydrolyzát kaseinu	17 g
papainový hydrolyzát sóji	3 g
chlorid sodný	5 g
hydrogenfosforečnan draselný	2,5 g
glukosa monohydrát	2,5 g
agar	15 g
polysorbát 80	10 g
voda	do 1000 ml

Polysorbát 80 se přidá k horkému roztoku ostatních složek po jejich rozvaření a bezprostředně před upravením objemu.

Půda C

pepton	6 g
hovězí výtažek	1,5 g
kvasničný výtažek	3 g
chlorid sodný	3,5 g
glukosa monohydrát	1 g
hydrogenfosforečnan draselný	3,68 g
dihydrogenfosforečnan draselný	1,32 g
voda	do 1000 ml

Půda D

výtažek ze srdce	1,5 g
kvasničný výtažek	1,5 g
pepton z kaseinu	5,0 g
glukosa monohydrát	1 g
chlorid sodný	3,5 g
hydrogenfosforečnan draselný	3,68 g
dihydrogenfosforečnan draselný	1,32 g
dusičnan draselný	2 g
voda	do 1000 ml

Půda E

pepton	5 g
masový výtažek	3 g
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	26,9 g
agar	10 g
voda	do 1000 ml

Hydrogenfosforečnan sodný se přidá jako sterilní roztok po sterilizaci půdy.

Půda F

pepton	9,4 g
kvasničný výtažek	4,7 g
hovězí výtažek	2,4 g
chlorid sodný	30,0 g
glukosa monohydrát	10,0 g
agar	23,5 g
voda	do 1000 ml

Půda G

glycerol	10 g
pepton	10 g
masový výtažek	10 g
chlorid sodný	3 g
agar	15 g
voda	do 1000 ml

pH 7 ± 1 po sterilizaci

2.7.3 Stanovení účinnosti kortikotropinu

Podstata zkoušky. Účinnost kortikotropinu je přímo úměrná poklesu obsahu kyseliny askorbové v nadledvinách potkana po hypofyzektomii. Stanovení se provádí v porovnání s účinkem mezinárodního standardu kortikotropinu nebo referečního přípravku, kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je čištěný a lyofilizovaný prasečí kortikotropin smíchaný s laktosou.

Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Pro stanovení se použijí laboratorní potkani o hmotnosti 100 g až 200 g, při čemž rozdíl mezi nejlehčím a nejtěžším zvířetem ve skupině nemá být větší než 15 g. Potkani se chovají za standardních podmínek nejméně 7 dní před pokusem. Den před vlastní zkouškou se zvířata zváží a provede se hypofyzektomie.[2)] Po operaci se potkani umístí do místnosti se stálou teplotou mezi 24 °C až 27 °C a kromě standardní diety a vody se jim umožní volný přístup k roztoku, obsahujícímu *glukosu R* (50 g/l) a *chlorid sodný R* (1,8 g/l). Není-li předepsáno jinak, referenční přípravek i zkoušený přípravek se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* na koncentraci odpovídající 5 m.j. kortikotropinu v 1 ml. K dalšímu ředění pro odstupňované dávky se použije roztok *želatiny R* (150 g/l). Roztoky se použijí nejpozději do 4 h po přípravě. Za 18 h až 36 h po hypofyzektomii se potkani znovu zváží a rozdělí do šesti skupin po osmi až deseti zvířatech. Třem skupinám se podává referenční přípravek a třem skupinám zkoušený přípravek ve třech odstupňovaných dávkách. Dávky se volí tak, aby po nejnižší dávce nastalo již hodnotitelné snížení obsahu kyseliny askorbové v nadledvinách a po nejvyšší nebylo ještě dosaženo největší snížení. Dávky se přepočtou na tělesnou hmotnost jednotlivého potkana a vstříknou se podkožně v objemu 0,5 ml/kg. Obvykle jsou vhodné dávky v pořadí: 1,0 m.j., 0,5 m.j. a 0,25 m.j. kortikotropinu na 100 g tělesné hmotnosti.

[2)] Místo hypofyzektomie je možno u potkanů použít blokádu funkce hypofýzy podáním vhodné látky např. dexamethasonu (viz článek *Corticotropinum*).

Přesně za tři hodiny po podání kortikotropinu se každému potkanovi v celkové anestezii vyjmou obě nadledviny, rychle se očistí od cizí tkáně a co nejrychleji se zváží, aby se předešlo ztrátě hmotnosti.

Vloží se do homogenizační zkumavky obsahující 2 ml čerstvě připraveného roztoku *kyseliny metafosforečné R* (25 g/l). Potkani se usmrtí a provede se kontrola úplnosti hypofyzektomie.

Nadledviny se zhomogenizují a obsah zkumavky se zředí stejným roztokem *kyseliny metafosforečné R* (25 g/l) na 10 ml. Za 30 min stání při pokojové teplotě se homogenát odstřeďuje a 7 ml čiré supernatantní tekutiny se přidá k čerstvě připravené směsi tohoto složení: 7 ml roztoku *octanu sodného R* (45,3 g/l) upraveného přidáním *kyseliny octové R* na pH 7, 3 ml *vody R*, 2 ml *dichlorfenolindofenolatu sodného RS*.

Za 30 s po smíchání se měří kolorimetricky absorpce. Použije se filtr s největší transmisí při 470 nm a transmise s rozsahem od 450 nm do 520 nm. Obsah kyseliny askorbové se odečte ze standardní kalibrační křivky, která se sestrojí z výsledků měření vhodných objemů čerstvě připraveného roztoku *kyseliny askorbové R* přidaných do roztoku *kyseliny metafosforečné R* (25 g/l). Obsah kyseliny askorbové se vyjádří v miligramech na 100 g tkáně nadledvin každého potkana. Vypočtou se průměrné hodnoty pro potkany ve všech třech dávkových skupinách referenčního přípravku a zkoušeného přípravku a výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou (*5.3*).

2.7.4 Stanovení účinnosti krevního koagulačního faktoru VIII

Podstata zkoušky. Při stanovení účinnosti krevního koagulačního faktoru VIII se využívá jeho biologického účinku jako kofaktoru aktivace faktoru X aktivovaným faktorem IX (faktor IXa) v přítomnosti iontů vápníku a fosfolipidů. Účinnost přípravku faktoru VIII se stanoví porovnáním množství potřebného k dosažení určité rychlosti tvorby faktoru Xa ve zkoušené směsi obsahující látky, jež se účastní aktivace faktoru X, s množstvím mezinárodního standardu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v m.j., jež je zapotřebí k dosažení stejné rychlosti tvorby faktoru Xa.

Mezinárodní jednotka faktoru VIII je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je lyofilizovaný koncetrát krevního koagulačního faktoru VIII. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Lidský koagulační faktor VIII BRP se kalibruje porovnáním s mezinárodním standardem a jeho účinnost se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách.

Chromogenní způsob stanovení se skládá ze dvou následných kroků: z aktivace faktoru X, která probíhá v reakční směsi složené z purifikovaných koagulačních faktorů a závisí na obsahu přítomného faktoru VIII, a z enzymatického štěpení chromogenního substrátu faktoru Xa, které je provázeno vznikem chromoforu, jehož množství se dá stanovit kvantitativně spektrofotometricky. Za vhodných podmínek stanovení je závislost rychlosti tvorby faktoru Xa na koncentraci faktoru VIII lineární. Stanovení se dá shrnout do následujícího schématu:

$$\textit{Krok 1} \quad \textit{faktor X} \xrightarrow[\textit{faktor IXa, fosfolipid, } Ca^{++}]{\textit{(aktivovaný) faktor VIII}} \textit{faktor Xa}$$

$$\textit{Krok 2} \quad \textit{chromogenní substrát} \xrightarrow{\textit{faktor Xa}} \textit{peptid} + \textit{chromofor}$$

Oba kroky zahrnují zkoumadla, která se dají zajistit z různých komerčních zdrojů. Ačkoliv složení jednotlivých zkoumadel může mít některé odlišnosti, jejich základní rysy jsou popsány v ná

sledující specifikaci. Odchylky od tohoto popisu jsou přípustné, pokud se prokáže, že výsledky získané za použití mezinárodního standardu lidského koagulačního faktoru VIII se významně neliší.

Při použití komerčních testovacích souprav se zachovává návod výrobce; je důležité prokázat, že použitá testovací souprava je pro stanovení vhodná.

Zkoumadla

Názvem koagulační zkoumadla (dále zkoumadla) se označuje skupina přečištěných bílkovin lidského nebo hovězího původu. Zahrnuje faktor X, faktor IXa a aktivátor faktoru VIII, obvykle trombin. Tyto bílkoviny jsou částečně přečištěné, nejlépe alespoň na 50 % a neobsahují nečistoty, které by mohly zasahovat do aktivace faktoru VIII nebo faktoru X. Faktor X je přítomen v množstvích, jejichž konečná koncentrace během prvého kroku stanovení je 10 nmol/l až 350 nmol/l, obvykle 15 nmol/l až 30 nmol/l. Faktor IXa vzniká aktivací přečištěného faktoru IX na faktor IXaβ pomocí faktoru XIa a následným přečištěním faktoru IXaβ z reakční směsi. Jeho konečná koncentrace během tvorby faktoru Xa je méně než 30 % koncentrace faktoru X, obvykle 1 nmol/l až 100 nmol/l, nejlépe 1 nmol/l až 10 nmol/l. Trombin může být přítomen ve formě svého prekurzoru protrombinu za předpokladu, že jeho aktivace ve zkoumadle je dostatečně rychlá, aby se při stanovení zajistila téměř okamžitá a úplná aktivace faktoru VIII. Fosfolipidy mohou být přírodního původu, např. extrakt z hovězího mozku nebo míchy nebo extrakt ze sójových bobů, nebo se mohou připravit synteticky a musí obsahovat v dostatečné míře, obvykle 15 % až 35 %, fosfatidylserin. Konečná koncentrace fosfolipidu během tvorby faktoru Xa je 1 nmol/l až 50 nmol/l, nejlépe 10 nmol/l až 35 nmol/l. Zkoumadlo obsahuje ionty vápníku v konečné koncentraci 5 nmol/l až 15 mmol/l. Ke konečné tvorbě faktoru Xa dochází v roztoku, který obsahuje nejméně 1 mg/ml lidského nebo hovězího albuminu, jehož pH je vhodně upraveno na hodnotu 7,3 až 8,0. Složky konečného zkoumadla se obvykle rozdělují alespoň do dvou oddělených zkoumadel, z nichž žádné nemá vlastní schopnost tvorby faktoru Xa. Po rekonstituci mohou být spojeny za předpokladu, že v nepřítomnosti faktoru VIII nemůže vzniknout významné množství faktoru Xa. V konečné inkubační směsi musí být faktor VIII jedinou složkou, která určuje rychlost.

V druhém kroku se vytvořený faktor Xa stanoví pomocí chromogenního substrátu specifického pro faktor Xa. Tím je obvykle derivát krátkého peptidu ze tří až pěti aminokyselin s připojenou skupinou chromoforu. Při odštěpení této skupiny z peptidického substrátu se její chromoformní vlastnosti posunou do vlnové délky, která umožňuje její spektrofotometrické stanovení. Substrát je obvykle rozpuštěný ve vodě a používá se v konečné koncentraci 0,2 mmol/l až 2 mmol/l. Substrát může dále zahrnovat vhodné inhibitory pro zastavení další tvorby faktoru Xa a pro potlačení aktivity trombinu a tím se zlepšuje selektivita stanovení faktoru Xa.

Postup stanovení

Pomocí odpovídajícího množstvím *vody R* se rekonstituuje celý obsah ampule s referenčním přípravkem i obsah ampule se zkoušeným přípravkem; přípravky se použijí ihned po rozpuštění. Rekonstituované přípravky se ještě dostatečně předředí na roztoky s obsahem mezi 0,5 m.j./ml až 2,0 m.j./ml.

Předředění se provádí plazmou pacienta s těžkou formou hemofilie A nebo uměle připraveným zkoumadlem poskytujícím výsledky, které se významně neliší od výsledků stanovení s hemofilickou plazmou a se stejným referenčním a zkoušeným přípravkem. Předředěné roztoky musí být stabilní po dobu potřebnou na stanovení, nejméně 30 min při 20 °C a použijí se do 15 min.

Připraví se další ředění referenčního a zkoušeného přípravku. K tomu se použije izotonický tlumivý roztok bez chelatotvorných složek, který obsahuje 1 % lidského nebo hovězího albuminu

a např. trometamol nebo imidazol a jehož pH se upraví na 7,3 až 8,0. Připraví se alespoň tři samostatná, nezávislá ředění obou přípravků, nejlépe každé samostatné ředění dvojmo. Připravují se ředění tak, aby konečná koncentrace faktoru VIII byla během kroku, kdy dochází k tvorbě faktoru Xa, nižší než 0,03 m.j./ml, přednostně nižší než 0,01 m.j./ml.

Připraví se kontrolní roztok, který obsahuje všechny složky kromě faktoru VIII.

Všechna ředění se připravují ve zkumavkách z plastu a ihned se použijí.

Krok 1. Předehřátá ředění referenčního přípravku faktoru VIII i zkoušeného přípravku se smíchají s odpovídajícím objemem předehřátého koagulačního zkoumadla nebo se směsí jeho oddělených složek. Takto připravené směsi se inkubují ve zkumavkách z plastů nebo v jamkách mikrotitračních destiček při 37 °C. Koncentrace jednotlivých komponent během tvorby faktoru Xa se musí řídit specifikací uvedenou výše v odstavci Zkoumadla. Ponechá se dostatečně dlouhá doba na aktivaci faktoru X, nejlépe taková, aby došlo k ukončení reakce před dosažením maximální hodnoty koncentrace faktoru Xa, aby se dosáhlo dostatečné lineární závislosti odpovědi na dávce. Aktivační čas se také vybírá tak, aby se dosáhlo lineárního průběhu křivky tvorby faktoru Xa v závislosti na čase. Vyhovující aktivační čas je obvykle mezi 2 min až 5 min, ale jsou možné odchylky, pokud se dosáhne lepší linearity závislosti odpovědi na dávce.

Krok 2. Aktivace se ukončí přidáním předehřátého zkoumadla, které obsahuje chromogenní substrát. Kvantitativně se stanoví rychlost štěpení substrátu, která musí lineárně záviset na koncentraci vzniklého faktoru Xa. Stanovení se provádí měřením změny absorbance spektrofotometrem při vhodné vlnové délce. Buď se sleduje absorbance kontinuálně, což umožňuje výpočet počáteční rychlosti štěpení substrátu, nebo se ukončí hydrolytická reakce po odpovídajícím časovém intervalu tím, že se sníží pH přidáním vhodného zkoumadla, jako je kyselina octová (50 % *V/V* $C_2H_4O_2$) nebo citronanový roztok (1 mol/l) o pH 3. Doba hydrolýzy se nastaví tak, aby se dosáhlo lineární tvorby chromoforu v závislosti na čase. Vhodná doba hydrolýzy je obvykle mezi 3 min a 15 min. Jsou ale možné odchylky, pokud se tím dosáhne lepší lineární závislosti odpovědi na dávce.

Ověří se validita stanovení a účinnost zkoušeného přípravku se vypočte obvyklými statistickými metodami pro stanovení poměru sklonů (např. Statistická analýza výsledků biologických zkoušek (*5.3*)).

2.7.5 Stanovení účinnosti heparinu

Antikoagulační účinnost heparinu se stanoví *in vitro* porovnáním jeho schopnosti zpomalovat za daných podmínek srážení rekalcifikované citronanové ovčí plazmy se stejnou schopností referenčního přípravku heparinu, kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je lyofilizovaná sodná sůl heparinu, připravená z vepřové střevní mukózy. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost *sodné soli heparinu BRP* se kalibruje v mezinárodních jednotkách v porovnání s mezinárodním standardem za pomoci některého dále uvedeného postupu stanovení.

Provede se stanovení jednou z následujících metod pro určení počátku srážení s použitím zkumavek a dalšího, pro zvolenou metodu vhodného zařízení:

a) přímá vizuální detekce, nejlépe při nepřímém osvětlení proti matnému černému pozadí,
b) spektrofotometrický záznam změny optické hustoty při vlnové délce asi 600 nm,
c) vizuální detekce změny tekutosti při ručním překlápění zkumavek,
d) automatický záznam změny tekutosti při míchání; dbá se, aby se při začáteční fázi srážení co nejvíce předešlo narušení roztoku.

Postup stanovení. Objemy uvedené v dalším textu slouží jako příklady a mohou být přizpůsobeny zvolenému zařízení za předpokladu, že jejich poměry zůstanou zachovány.

Sodná sůl heparinu BRP se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby výsledný roztok obsahoval v mililitru přesně známý počet mezinárodních jednotek. Obdobně se připraví roztok zkoušeného přípravku o stejné předpokládané účinnosti. Pomocí roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se z obou roztoků připraví geometrické řady ředění tak, aby čas srážení zaznamenaný pro nejnižší koncentraci byl nejméně 1,5násobek času potřebného ke srážení při slepé zkoušce a aby při nejvyšší koncentraci bylo dosaženo vyhovujícího průběhu závislosti log dávka-odezva, podle stanovení v předběžné zkoušce.

Do ledové vodní lázně se vloží dvanáct zkumavek po dvojicích označených T_1, T_2 a T_3 pro dvojí měření tří ředění zkoušeného přípravku a S_1, S_2 a S_3 pro dvojí měření tří ředění referenčního přípravku. Do každé zkumavky se odměří 1,0 ml rozmrazené *plazmy substrátu R1* a 1,0 ml vhodně zředěného zkoušeného přípravku nebo 1,0 ml vhodně zředěného referenčního přípravku. Po každém přídavku se obsah zkumavek opatrně promíchá tak, aby se netvořily bubliny. Zkumavky v pořadí S_1, S_2, S_3, T_1, T_2 a T_3 se přenesou do vodní lázně o teplotě 37 °C na dobu 15 min. Poté se do každé zkumavky odměří 1 ml *zkoumadla cefalinového R,* ke kterému byl přidán vhodný aktivátor jako je kaolin, v takovém množství, aby srážení ve slepé zkoušce nastalo v čase kratším než 60 s. Při aktivaci kaolinem se bezprostředně před použitím připraví směs stejných objemů *zkoumadla cefalinového R* a suspenze *kaolinu lehkého R* (4 g/l) v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Přesně za 2 min se do každé zkumavky přidá 1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (3,7 g/l) a zvolenou metodou (a, b, c nebo d) se stanoví čas srážení v sekundách mezi tímto posledním přídavkem a začátkem srážení. Čas srážení ve slepé zkoušce se obdobně stanoví tak, že namísto roztoku heparinu se do zkumavky odměří 1 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Slepé zkoušky se zařadí na začátek a na konec postupu měření. Hodnoty stanovené pro dvojici slepých zkoušek se nemají významně lišit. Střední hodnoty časů srážení zaznamenaných pro jednotlivé dvojice se převedou do logaritmického tvaru. Postup se zopakuje za použití čerstvých roztoků, při dodržení pořadí pro inkubaci T_1, T_2, T_3, S_1, S_2 a S_3. Výsledky se vypočítají za použití obvyklých statistických metod.

Provedou se vždy nejméně tři nezávislá stanovení. Pro každé stanovení se připraví čerstvé roztoky referenčního přípravku, zkoušeného přípravku a jiné, čerstvě rozmražené plazmy.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví z výsledků všech měření za použití obvyklých statistických metod. Jestliže rozptyl mezi jednotlivými stanoveními je významný na $P = 0{,}01$, může se stanovit výsledná účinnost výpočtem prostého průměru z jednotlivých stanovení.

2.7.6 Stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu

Podstata zkoušky. Účinnost adsorbované vakcíny proti záškrtu se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat před účinkem difterického toxinu s dávkou referenčního přípravku, vyjádřenou v mezinárodních jednotkách, která poskytuje stejnou ochranu. Toxin se vstřikuje buď intradermálně a sleduje se vznik specifického erytému, nebo subkutánně a sleduje se úhyn zvířat.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Tento standard pozůstává z určitého množství difterického toxoidu adsorbovaného na hydroxid hlinitý. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Metoda sledování erytému po intradermálním podání

Výběr a rozdělení pokusných zvířat. Ke zkoušce se použijí zdravá bílá morčata z jednoho chovu a takové velikosti, která umožní předepsaný počet injekčních podání. Rozdíl v hmotnosti mezi nejtěžším a nejlehčím zvířetem nepřesahuje 100 g. Zvířata se rozdělí do nejméně šesti stejně velkých skupin. Počet zvířat ve skupině postačuje k tomu, aby byly splněny dále předepsané požadavky na platnost zkoušky. Pokud není prokázána stabilita toxinu nebo tento toxin není dostatečně standardizován, přibere se pět morčat jako neimunizovaná kontrola. Morčata jsou stejného pohlaví nebo se samci a samice rovnoměrně rozdělí do skupin.

Výběr toxinu. Difterický toxin, který se použije ke zkoušce, obsahuje 67 až 133 Lr/100 v 1 Lf a 25 000 až 50 000 nejmenších dávek reagujících v kůži morčat v 1 Lf. Pokud je prokázána stabilita tohoto toxinu, není třeba ověřovat jeho účinnost při každém stanovení.

Příprava roztoku toxinu. Toxin se bezprostředně před použitím zředí vhodným rozpouštědlem tak, aby 0,2 ml obsahovalo asi 0,0512 Lf. Z něho se připraví řada pěti čtyřnásobných ředění obsahujících asi 0,0128, 0,0032, 0,0008, 0,0002 a 0,00005 Lf v 0,2 ml.

Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny. Zkoušený přípravek a referenční přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby jednotlivá ředění byla odstupňována nejvýše 2,5násobně a aby střední ředění při subkutánním podání (v dávce 1,0 ml na morče) dovolila po podání toxinu vznik intradermální reakce asi u tří ředění toxinu. Pro každé ředění se vybere jedna skupina morčat a všem morčatům ve skupině se subkutánně vstříkne po 1,0 ml příslušného ředění. Po 28 dnech se všem morčatům oholí oba boky a každému zvířeti se intradermálně vstříkne 0,2 ml každého z šesti ředění toxinu na šest různých míst tak, aby vzájemné působení sousedících míst bylo co nejmenší.

Stanovení účinnosti toxinu. Je-li třeba, vstříknou se neimunizovaným kontrolním zvířatům roztoky obsahující 80, 40, 20, 10 a 5 miliontin Lf toxinu.

Odečítání a hodnocení výsledků. 48 h po podání toxinu se vyšetří všechna místa podání a u každého zvířete se formou poměru zaznamená počet míst se specifickým difterickým erytémem a počet míst bez této reakce. Hodnoty těchto poměrů pro všechna zvířata, jimž bylo podáno stejné ředění očkovací látky, se spojí a zaznamenají do tabulky. Tyto údaje se vhodnou transformací, jako např. (hodnota poměru)^2 nebo arcsin ((hodnota poměru/6)$^{\frac{1}{2}}$), použijí na získání odhadu relativní účinnosti každé zkoušené vakcíny pomocí kvantitativního hodnocení rovnoběžných přímek.

Požadavky na platnost zkoušky. Zkouška je platná, jsou-li splněny tyto požadavky:

- zkoušená vakcína a referenční přípravek vykazují průměrný počet reakcí při nejnižší dávce nižší než tři a při nejvyšší dávce vyšší než tři,
- je-li třeba, ředění toxinu obsahující 40 miliontin Lf *dávky* vyvolá pozitivní erytémovou reakci nejméně u 80 % kontrolních morčat a ředění obsahující 20 miliontin Lf *dávky* nevyvolá u nejméně 80 % kontrolních zvířat žádnou reakci (nejsou-li splněna tato kritéria, vybere se jiný toxin),
- interval spolehlivosti stanovení (P = 0,95) je v rozmezí 50 % až 200 % stanovené účinnosti,
- statistické hodnocení neukazuje odchylku od linearity a rovnoběžnosti.

Zkouška se může opakovat, ale jestliže se provede více stanovení, výsledky všech platných stanovení se sloučí.

Metoda sledování úhynu

Výběr a rozdělení pokusných zvířat. Ke zkoušce se použijí zdravá morčata o hmotnosti 250 g až 350 g pocházející z jednoho chovu. Morčata se rozdělí do nejméně šesti stejně velkých skupin. Počet zvířat ve skupině postačuje k tomu, aby byly splněny dále předepsané požadavky na platnost zkoušky. Pokud není prokázána stabilita toxinu nebo není-li tento toxin dostatečně standardizován,

přiberou se další čtyři skupiny po pěti morčatech jako neimunizovaná kontrola. Morčata jsou stejného pohlaví nebo se samci a samice rovnoměrně rozdělí do skupin.

Výběr toxinu. Vybere se takový difterický toxin, který v 1 ml obsahuje nejméně 100 LD_{50}. Pokud je prokázána stabilita tohoto toxinu, není třeba ověřovat jeho střední smrtnou dávku při každém stanovení.

Příprava roztoku toxinu. Bezprostředně před použitím se toxin zředí vhodným rozpouštědlem tak, aby se získal roztok toxinu obsahující v 1 ml asi 100 LD_{50}. Je-li třeba, zředí se dále část roztoku toxinu stejným rozpouštědlem v poměrech 1 : 32, 1 : 100 a 1 : 320.

Stanovení účinnosti vakcíny. Zkoušený přípravek a referenční přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby jednotlivá ředění byla odstupňována nejvýše 2,5násobně a aby střední ředění po subkutánním podání (v dávce 1,0 ml na morče) ochránila přibližně 50 % zvířat před letálním účinkem předepsané dávky difterického toxinu podaného subkutánně. Pro každé ředění se vybere jedna skupina morčat a všem morčatům ve skupině se subkutánně vstříkne po 1,0 ml příslušného ředění. Po 28 dnech se všem zvířatům subkutánně vstříkne 1,0 ml roztoku toxinu (100 LD_{50}).

Stanovení účinnosti toxinu. Je-li třeba, připraví se na podání roztoku toxinu a jeho tří ředění čtyři skupiny po pěti morčatech. Každému zvířeti ve skupině se subkutánně vstříkne 1,0 ml příslušného ředění toxinu.

Odečítání a hodnocení výsledků. Za 4 dny od podání toxinu se odečte počet přežívajících morčat. Účinnost zkoušené vakcíny se vyhodnotí porovnáním s účinností referenčního přípravku na základě poměru počtu přežívajících zvířat v každé skupině imunizovaných morčat, za použití obvyklých statistických metod.

Požadavky na platnost zkoušky. Zkouška je platná, jsou-li splněny tyto požadavky:

- 50% ochranná dávka zkoušeného a referenčního přípravku je mezi nejvyšší a nejnižší dávkou podanou morčatům,
- v případě, že čtyřem skupinám po pěti morčatech byl vstříknut roztok toxinu a jeho tři ředění, má počet uhynulých zvířat ukázat, že použitá dávka toxinu byla přibližně 100 LD_{50},
- interval spolehlivosti stanovení (P = 0,95) je v rozmezí 50 % až 200 % stanovené účinnosti,
- statistické hodnocení neukazuje odchylku od linearity a rovnoběžnosti.

Zkouška se může opakovat, ale jestliže se provede více stanovení, výsledky všech platných stanovení se sloučí.

2.7.7 Stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli

Podstata zkoušky. Účinnost vakcíny proti dávivému kašli se stanoví porovnáním dávky potřebné na ochranu myší před účinkem intracerebrálně podané letální dávky bakterie *Bordetella pertussis* s dávkou referenčního přípravku vyjádřenou v mezinárodních jednotkách, která poskytuje stejnou ochranu.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušené očkovací látky proti dávivému kašli. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Výběr a rozdělení pokusných zvířat. Ke zkoušce se použijí zdravé myši, nejvýše 5 týdnů staré, vhodného kmene a pocházející z jednoho chovu. Rozdíl hmotnosti mezi nejtěžší a nejlehčí myší nepřesahuje 5 g. Vytvoří se šest skupin po nejméně šestnácti myších a čtyři skupiny po deseti myších. Myši jsou stejného pohlaví nebo se samci a samice rovnoměrně rozdělí do skupin.

Výběr infekčního kmene a příprava jeho suspenze k infekci. Vybere se vhodný kmen *B. pertussis*, který je schopen způsobit úhyn myší v průběhu 14 dní po intracerebrální infekci. Kmen není vhodný, jestliže za 48 h po aplikaci uhyne víc než 20 % myší. Připraví se subkultura kmene a získané bakterie *B. pertussis* se suspendují v roztoku obsahujícím kaseinový hydrolyzát (10 g/l) a *chlorid sodný R* (6 g/l) s hodnotou pH v rozmezí 7,0 až 7,2 nebo v jiném vhodném roztoku. Změří se zákal suspenze a ve stejném roztoku se připraví řada ředění. Na každé ředění se použije skupina deseti myší, kterým se intracerebrálně vstříkne po 0,02 ml nebo 0,03 ml příslušného ředění. Po 14 dnech se v každé skupině spočítají přežívající myši a z výsledků se vypočítá očekávaný zákal suspenze, která bude obsahovat 100 LD_{50} v každé infekční dávce.

Pro zkoušení očkovací látky se připraví čerstvá subkultura téhož kmene *B. pertussis* a z ní suspenze bakterií se zákalem odpovídajícím přibližně 100 LD_{50} v každé infekční dávce. Z této suspenze se připraví tři ředění.

Stanovení účinnosti. Připraví se tři odstupňovaná ředění zkoušené vakcíny a tři podobná ředění referenčního přípravku tak, aby se mohlo očekávat, že střední ředění uchrání asi 50 % myší před letálním účinkem infekční dávky *B. pertussis.* Doporučené dávky jsou 1/8, 1/40 a 1/200 lidské dávky zkoušené vakcíny a 0,5, 0,1 a 0,02 mezinárodní jednotky referenčního přípravku, přičemž jsou tato množství obsažena v objemu nepřesahujícím 0,5 ml. Každým z těchto šesti ředění se imunizuje jedna skupina myší obsahující šestnáct zvířat; každé myši se vstříkne intraperitoneálně jedna dávka příslušného ředění. Za 14 až 17 dní se všechny myši infikují intracerebrálně jednou dávkou infekční suspenze. Stejnou dávkou infekční suspenze a z ní připravenými třemi ředěními se též intracerebrálně infikují čtyři skupiny po deseti myších. Z hodnocení se vyloučí všechny myši uhynulé v průběhu 48 h po infikování. Po 14 dnech se v každé skupině spočítají přežívající myši. Na základě počtů přežívajících zvířat v jednotlivých skupinách (po nejméně šestnácti zvířatech) se vyhodnotí účinnost zkoušené vakcíny v porovnání s účinností referenčního přípravku.

Požadavky na platnost zkoušky. Zkouška je platná, jsou-li splněny tyto požadavky:

- 50% ochranná dávka zkoušeného a referenčního přípravku je mezi nejvyšší a nejnižší dávkou podanou myším,
- počet myší uhynulých ve čtyřech skupinách po deseti zvířatech po podání infekční suspenze a jejích ředění udává, že infekční dávka byla přibližně 100 LD_{50},
- statistické hodnocení neukazuje odchylku od linearity nebo rovnoběžnosti.

Zkouška se může opakovat, ale jestliže se provede více stanovení, výsledky všech platných stanovení se sloučí.

2.7.8 Stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu

Podstata zkoušky. Účinnost adsorbované vakcíny proti tetanu se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat nebo myší před účinkem subkutánní injekce paralyzující dávky tetanického toxinu s dávkou referenčního přípravku vyjádřenou v mezinárodních jednotkách, která poskytuje stejnou ochranu. V zemích, kde není povinná metoda s paralýzou, je možno použít metodu střední smrtné dávky (LD_{50}). Pro ni je počet zvířat a postup totožný s popsanou metodou paralýzy, avšak zkouška se místo podle příznaků tetanické paralýzy hodnotí podle úhynu zvířat.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství tetanického toxoidu adsorbovaného na hydroxid hlinitý. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Zkouška na morčatech

Výběr a rozdělení pokusných zvířat. Ke zkoušce se použijí zdravá morčata z jednoho chovu, jejichž hmotnost je v rozmezí 250 g až 350 g. Zvířata se rozdělí do nejméně šesti stejně velkých skupin. Počet zvířat ve skupině postačuje k tomu, aby byly splněny dále předepsané požadavky na platnost zkoušky. Pokud není prokázána stabilita toxinu nebo tento toxin není dostatečně standardizován, přiberou se další čtyři skupiny po pěti morčatech jako neimunizovaná kontrola. Morčata jsou stejného pohlaví nebo se samci a samice rovnoměrně rozdělí do skupin.

Výběr toxinu. Zvolí se tetanický toxin obsahující v 1 ml nejméně padesátinásobek 50% paralyzující dávky. Pokud je prokázána stabilita tohoto toxinu, není třeba ověřovat paralyzující dávku při každém stanovení.

Příprava roztoku toxinu. Toxin se bezprostředně před použitím zředí vhodným rozpouštědlem tak, aby 1 ml obsahoval asi padesátinásobek 50% paralyzující dávky. Je-li třeba, zředí se dále část roztoku toxinu stejným rozpouštědlem v poměrech 1 : 16, 1 : 50 a 1 : 160.

Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny. Zkoušená vakcína a referenční přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby jednotlivá ředění byla odstupňována nejvýše 2,5násobně a aby střední ředění při subkutánním podání (v dávce 1,0 ml na morče) ochránila přibližně 50 % zvířat před paralyzujícím účinkem předepsané dávky tetanického toxinu podaného subkutánně. Pro každé ředění se vybere jedna skupina morčat a všem morčatům ve skupině se subkutánně vstříkne po 1,0 ml příslušného ředění. Po 28 dnech se každému zvířeti subkutánně vstříkne 1,0 ml roztoku toxinu (padesátinásobek 50% paralyzující dávky).

Stanovení účinnosti toxinu. Je-li třeba, vstříkne se neimunizovaným kontrolním zvířatům (čtyři skupiny po pěti morčatech) subkutánně po 1,0 ml roztoku toxinu nebo jeho příslušného ředění tak, že každé skupině se podá jedna koncentrace.

Odečítání a hodnocení výsledků. Zvířata se kontrolují dvakrát denně, přičemž se vyřadí všechna zvířata se zřetelnými příznaky tetanické paralýzy a šetrně se utratí. Pět dní po podání roztoku toxinu se spočítají zvířata bez příznaků paralýzy. Účinnost zkoušené vakcíny se vyhodnotí za použití obvyklých statistických metod porovnáním s účinností referenčního přípravku na základě poměru počtu imunizovaných morčat bez příznaků paralýzy v každé skupině po podání roztoku toxinu.

Požadavky na platnost zkoušky. Zkouška je platná, jsou-li splněny tyto požadavky:

- 50% ochranná dávka zkoušeného a referenčnho přípravku je mezi nejvyšší a nejnižší dávkou podanou zvířatům,
- v případě, že byl čtyřem skupinám po pěti morčatech vstříknut roztok toxinu a jeho tři ředění, má počet paralyzovaných zvířat ukázat, že použitá dávka toxinu byla přibližně padesátinásobkem 50% paralyzující dávky,
- interval spolehlivosti stanovení (P = 0,95) je mezi 50 % až 200 % stanovené účinnosti,
- statistické hodnocení neukazuje odchylku od linearity a rovnoběžnosti.

Zkouška se může opakovat, ale jestliže se provede více stanovení, výsledky všech platných stanovení se sloučí.

Zkouška na myších

Výběr a rozdělení pokusných zvířat. Ke zkoušce se použijí zdravé myši z jednoho chovu, hmotnosti 14 g až 20 g. Myši se rozdělí do nejméně šesti stejně velkých skupin. Počet zvířat ve skupině postačuje k tomu, aby byly splněny dále předepsané požadavky na platnost zkoušky. Pokud není prokázána stabilita toxinu nebo tento toxin není dostatečně standardizován, přiberou se další

čtyři skupiny po šesti myších jako neimunizovaná kontrola. Myši jsou stejného pohlaví nebo se samci a samice rovnoměrně rozdělí do skupin.

Výběr toxinu. Zvolí se tetanický toxin obsahující v 1 ml nejméně stonásobek 50% paralyzující dávky. Pokud je prokázána stabilita tohoto toxinu, není třeba ověřovat paralytickou dávku při každém stanovení.

Příprava roztoku toxinu. Toxin se bezprostředně před použitím zředí vhodným rozpouštědlem tak, aby v 0,5 ml byl obsažen asi padesátinásobek 50% paralyzující dávky. Je-li to třeba, zředí se dále část roztoku toxinu stejným rozpouštědlem v poměrech 1 : 16, 1 : 50 a 1 : 160.

Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny. Zkoušená vakcína a referenční přípravek se naředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby jednotlivá ředění byla odstupňována nejvýše 2,5násobně a aby střední ředění po subkutánním podání (v dávce 0,5 ml na myš) ochránila přibližně 50 % zvířat před paralyzujícím účinkem předepsané dávky tetanického toxinu podaného subkutánně. Pro každé ředění se vybere jedna skupina myší a všem myším ve skupině se subkutánně vstříkne po 0,5 ml příslušného ředění. Po 28 dnech se každému zvířeti subkutánně vstříkne 0,5 ml roztoku toxinu (padesátinásobek 50% paralyzující dávky).

Stanovení účinosti toxinu. Je-li třeba, vstříkne se neimunizovaným kontrolním zvířatům (čtyři skupiny po šesti myších) subkutánně po 0,5 ml roztoku toxinu nebo jeho příslušného ředění tak, že každé skupině se podá jedna koncentrace.

Odečítání a hodnocení výsledků. Zvířata se kontrolují dvakrát denně, přičemž se vyřadí všechna zvířata se zřetelnými příznaky tetanické paralýzy a šetrně se utratí. Čtyři dny po podání roztoku toxinu se spočítají zvířata bez příznaků paralýzy. Účinnost zkoušené vakcíny se vyhodnotí za použití obvyklých statistických metod porovnáním s účinností referenčního přípravku na základě poměru počtu imunizovaných zvířat bez příznaků paralýzy v každé skupině.

Požadavky na platnost zkoušky. Zkouška je platná, jsou-li splněny tyto požadavky:

- 50% ochranná dávka zkoušeného a referenčního přípravku je mezi nejvyšší a nejnižší dávkou přípravků podaných zvířatům,
- v případě, že byl čtyřem skupinám po šesti myších vstříknut roztok toxinu a jeho tři ředění, má počet paralyzovaných zvířat ukázat, že použitá dávka toxinu byla přibližně padesátinásobkem 50% paralyzující dávky,
- interval spolehlivosti stanovení (P = 0,95) je v rozmezí 50 % až 200 % stanovené účinnosti,
- statistické hodnocení neukazuje odchylku od linearity a rovnoběžnosti.

Zkouška se může opakovat, ale jestliže se provede více stanovení, výsledky všech platných stanovení se sloučí.

2.7.9 Zkouška na Fc funkci imunoglobulinu

Podstata zkoušky. Srovnání průběhu hemolýzy senzibilizovaných lidských červených krvinek v přítomnosti zkoušeného přípravku s průběhem hemolýzy v přítomnosti porovnávacího lidského imunoglobulinu.

Příprava zkoumadel

Stabilizovaná lidská krev. Lidská krev skupiny 0 se odebere do antikoagulačního roztoku ACD. Stabilizovaná krev se uchovává při 4 °C nejdéle 3 týdny.

Tlumivý roztok fosforečnanový s chloridem sodným o pH 7,2. 1,022 g *hydrofosforečnanu sodného bezvodého R*, 0,336 g *dihydrofosforečnanu sodného bezvodého R* a 8,766 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 800 ml *vody R* a zředí se jí na 1000 ml.

Zásobní roztok hořčíku a vápníku. 1,103 g *chloridu vápenatého R* a 5,083 g *chloridu hořečnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Zásobní tlumivý roztok barbitalový. 207,5 g *chloridu sodného R* a 25,48 g *barbitalu sodné soli R* se rozpustí v 4000 ml *vody R* a pH se upraví *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 7,3. Přidá se 12,5 ml zásobního roztoku hořčíku a vápníku a zředí se *vodou R* na 5000 ml. Roztok se filtruje membránovým filtrem (0,22 μm) a uchovává při 4 °C ve skleněných obalech.

Tlumivý roztok barbitalu s albuminem. 0,150 g *albuminu hovězího R* se rozpustí v 20 ml zásobního tlumivého roztoku barbitalového a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Roztok taninu. 10 mg *taninu R* se rozpustí ve 100 ml tlumivého roztoku fosforečnanového s chloridem sodným o pH 7,2. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Morčecí komplement. Z krve nejméně deseti morčat se připraví směsné sérum. Oddělí se od sražené krve odstředěním při asi 4 °C. Sérum se uchovává v malých množstvích při teplotě nižší než -70 °C. Sérum se naředí tlumivým roztokem barbitalovým s albuminem na 125 až 200 CH_{50}v l ml bezprostředně před započetím hemolýzy účinkem komplementu a po dobu zkoušky se uchovává v lázni s ledem.

Antigen zarděnek. Volí se antigen zarděnek, který je vhodný na stanovení titru v hemaglutinačně inhibičním testu (titru HIT). Titr je větší než 256 HA jednotek.

Příprava taninovaných lidských červených krvinek. Z dostatečného objemu stabilizované lidské krve se odstředěním oddělí lidské červené krvinky. Nejméně třikrát se promyjí tlumivým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným o pH 7,2. Připraví se 2% (*V/V*) suspenze v témže roztoku, jímž se naředí i 0,1 ml roztoku taninu na 7,5 ml (konečná koncentrace 1,3 mg/l). Smíchá se 1 objemový díl čerstvě naředěného roztoku taninu s 1 objemovým dílem suspenze červených krvinek a směs se inkubuje 10 min při 37 °C. Krvinky se oddělí odstředěním (10 min při 400 g až 800 g), supernatant se odstraní a červené krvinky se jednou promyjí tlumivým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným o pH 7,2. V tomtéž roztoku se taninované krvinky resuspendují na koncentraci 1 % (*V/V*).

Taninované lidské červené krvinky s antigenem. Potřebný objem (V_s) taninovaných krvinek se smíchá s antigenem zarděnek v poměru 0,2 ml antigenu na 1 ml suspenze krvinek. Po inkubaci 30 min při 37 °C se krvinky oddělí odstředěním (10 min při 400 g až 800 g). Supernatant se oddělí a ponechá se jen objem 200 μl. Supernatant se nahradí stejným objemem tlumivého roztoku barbitalového s albuminem. Krvinky se resuspendují, oddělí se popsaným způsobem a promývací postup se opakuje. Zbylý objem 200 μl se doplní na tři čtvrtiny objemu V_s. Pro tento objem se zavede označení počáteční objem (V_i). Z něho se odebere 100 μl a zbylý objem se označí (V_r). K odebranému vzorku 100 μl se přidá 900 μl tlumivého roztoku barbitalového s albuminem a stanoví se počáteční absorbance (A) při 541 nm. Při naředění objemu (V_r) tlumivým roztokem barbitalovým s albuminem na A-násobnou hodnotu podle vzorce $V_f = V_r$ x A se získá konečný nastavený objem senzibilizovaných červených krvinek (V_f) a nastaví se na hodnotu l,0 ± 0,1 při desetinásobném ředění.

Vlastní zkouška

Vazba protilátky na taninované lidské červené krvinky s antigenem. Následující roztoky se připravují postupně a dvojmo. Pro každý roztok se používá samostatná semimikrokyveta (např. na jedno použití) nebo zkumavka:

1. *Zkoušené roztoky.* Zkoušený přípravek se, pokud je to třeba, upraví *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* na pH 7 a naředí se tlumivým roztokem barbitalovým s albuminem tak, aby obsahoval 30 mg až 40 mg imunoglobulinu a objem se upraví na 900 μl.

2. *Porovnávací roztoky.* Připraví se stejným způsobem jako zkoušené roztoky za použití *lidského imunoglobulinu BRP.*
3. *Kontrola komplementu.* Používá se 900 μl tlumivého roztoku barbitalového s albuminem.

Do každé kyvety nebo zkumavky se přidá 100 μl suspenze senzibilizovaných lidských červených krvinek. Obsah se dobře promíchá.

Provede se inkubace 15 min při obyčejné teplotě, přidá se 1000 μl tlumivého roztoku barbitalového s albuminem a buňky se oddělí odstředěním kyvet nebo zkumavek 10 min při 1000 g. Odstraní se 1900 μl supernatantu a nahradí se 1900 μl tlumivého roztoku barbitalového s albuminem. Celý promývací proces se opakuje. Supernatant se opět odstraní a nakonec se ponechá objem 200 μl. Zkoušené vzorky se mohou skladovat 24 h v dobře uzavřených kyvetách nebo zkumavkách při 4 °C.

Hemolýza vyvolaná komplementem. Před zahájením hemolýzy se přidá ke zkoušenému vzorku 600 μl tlumivého roztoku barbitalového s albuminem, který se nejprve předehřeje na 37 °C. Buňky se pečlivě resuspendují opakovaným pipetováním (nejméně pětkrát) a kyveta se umístí do nosiče spektrofotometru vybaveného termostatem. Po 2 min se přidá 200 μl morčecího komplementu nastaveného na 125 až 200 CH_{50}/ml. Obsah se důkladně promíchá dvojnásobným pipetováním. Po druhém pipetování se okamžitě začne zaznamenávat absorbance při 541 nm v závislosti na čase. Tlumivý roztok barbitalový s albuminem se používá jako srovnávací tekutina. Měření se zastaví, když časová závislost absorbance jasně překročí inflexní bod.

Hodnocení

Stanoví se strmost (S) křivky hemolýzy v inflexním bodě takto: Rozdělí se nejstrmější část na vhodné časové intervaly Δt (například Δt = 1 min) a vypočte se S jako změna absorbance ΔA jednoho časového intervalu (na příklad ΔA za 1 min). Největší strmost je hledaná strmost v inflexním bodě (S_{exp}). Stanoví se ještě absorbance na počátku měření (A_s) extrapolací křivky, která je v prvních několika minutách téměř lineární a rovnoběžná s časovou osou. Strmost (S_{exp}) se koriguje pomocí vzorce:

$$S' = \frac{S_{exp}}{A_s} .$$

Vypočítá se aritmetický průměr korigovaných hodnot strmosti (S) pro každý přípravek. Pro funkci Fc se vypočítá index (I_{Fc}) podle vzorce:

$$I_{Fc} = \frac{100\ (\overline{S'} - \overline{S'_c})}{\overline{S'_s} - \overline{S'_c}} ,$$

v němž značí:

$\overline{S'}$ - aritmetický průměr korigované strmosti zkoušeného přípravku,

$\overline{S'_s}$ - aritmetický průměr korigované strmosti referenčního přípravku,

$\overline{S'_c}$ - aritmetický průměr korigované strmosti zjištěný v pokusech s kontrolou komplementu.

Vypočtený index Fc funkce zkoušeného přípravku nemá být menší než hodnota uvedená v příbalovém letáku referenčního přípravku.

2.8 Farmakognostické metody

Vzorkování drog **N**

Před odběrem vzorků se provede senzorická kontrola obsahu jednotlivých balení, zaměřená zejména na:
- nesprávné označení,
- nestejnorodost,
- trvale zatuchlý pach, případně cizí pach, nebo naopak absence pachu charakteristického pro danou drogu,
- napadení plísněmi, prozrazující se změnami pachu, barvy,
- napadení škůdci,
- zvlášť hrubé mechanické znečištění.

Při zjištění uvedených závad se odběr vzorků neprovádí.

Odběr vzorků

Postup. Z balení do 1 kg se odebere z celkového, dobře promíchaného množství jeden vzorek dostatečný pro zkoušení. Z balení od 1 kg do 5 kg se odeberou tři vzorky stejného objemu z horní, střední a spodní části balení, každý v dostatečném množství pro provedení zkoušek. Z balení větších než 5 kg se odeberou tři vzorky, každý o hmotnosti nejméně 250 g, z horní, střední a spodní části balení. Vzorky se pečlivě promíchají a ze směsi se odebere množství dostatečné k provedení zkoušek.

Četnost vzorků. Je-li počet balení *(n)* tři nebo méně, odeberou se vzorky z každého balení, jak je uvedeno výše (viz *Postup)*. Je-li počet balení větší než tři, odeberou se vzorky, jak je uvedeno výše (viz *Postup)* z $\sqrt{n} + 1$ balení, je-li třeba, se zaokrouhlením na nejbližší celé číslo.

Úprava vzorku

Hrubý vzorek získaný po promíchání vzorků z jednotlivých balení se rozprostře ve stejnoměrné vrstvě do tvaru čtverce. Ten se úhlopříčně rozdělí na čtyři stejné části, z nichž dvě protilehlé se včetně všech příměsí promíchají a znovu se rozprostřou do čtverce. Postup se opakuje až do získání konečného vzorku v množství dostačujícím k provedení všech předepsaných zkoušek.

Vzorky se zkoušejí bezprostředně po odběru. Není-li to možné, uchovávají se tak, aby zůstaly zachovány všechny znaky a vlastnosti drogy, ve vzduchotěsných obalech, za ochrany před světlem.

Stupeň rozdrobnění **N**

Ke stanovení stupně rozdrobnění se používají, není-li uvedeno jinak, síta *(2.1.4)* 8000, 2800, 2000 a 250. Požadovaný stupeň rozdrobnění závisí na charakteru drogy a účelu jejího použití a udává se číslem síta (v závorkách za názvem drogy v textu jednotlivých článků), kterým má projít, není-li uvedeno jinak, nejméně 50 % drogy. U řezaných drog prachový podíl procházející sítem 250 má být nejvýše 5 %.

U práškovaných drog má předepsaným sítem projít nejméně 80 % drogy, zbylý podíl může procházet sítem nejvýše o jeden stupeň hrubším.

Není-li uvedeno jinak, jsou drogy určené k použití buď samostatně, nebo k přípravě čajových směsí upravovány takto:

Tab. N-1

Stupeň rozdrobnění, síto	Droga
řezané, 8000 drobně řezané, 2800 velmi drobně řezané, 2000	kůry, květy, listy, oplodí natě kořeny, plody, semena

Výjimkou jsou níže uvedené drogy, které se upravují takto:

Tab. N-2

Droga	Síto	Podíl procházející sítem je nejméně
Althaeae radix, Aurantii pericarpium dulce, Belladonnae radix, Levistici radix, Lichenislandicus, Liquiritiae radix, Marrubii herba, Ononidis radix, Petroselini radix, Salviae herba	8000	50 %
Strychni semen	2800	50 %
Centaurii herba, Cinchonae cortex, Hyperici herba, Thymi herba, Uvae ursi folium	2000	50 %
Absinthii herba, Millefolii herba	2800	40 %
Rhei radix	2000	40 %

Drogy určené k výrobě nálevových sáčků se upravují na velikost částic procházejících síty 250 až 2000.

Pokud jsou řezané drogy určeny pro lékové formy připravované extrakcí, jejich jemnější podíly, pokud není uvedeno jinak, se neodstraňují. K tomuto účelu je možno použít i jemnější podíly získané při úpravě drog určených pro přípravu čajových směsí.

Postup. Nejméně 50 g drogy (u kořenů a kůr nejméně 100 g) se prosévá kontrolními síty. Postupuje se od nejjemnějšího síta k sítu nejhrubšímu a prosévá se kruhovým pohybem tak dlouho, až je propad jednotlivých částic jen ojedinělý. Prosévání je třeba provádět opatrně tak, aby nedocházelo k mechanickému poškození drogy.

Je možno použít i mechanického prosévacího přístroje s kruhovým pohybem při vzestupném uspořádání sít. Není-li uvedeno jinak, prosévá se 2 min při frekvenci 200 otáček/min. Podíly propadlé jednotlivými síty se zváží a jejich hmotnost se vyjádří v procentech.

2.8.1 Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové

Je to podíl získaný po extrakci síranového popela nebo celkového popela *kyselinou chlorovodíkovou R*, přepočítaný na 100 g drogy.

Do kelímku obsahujícího zbytek po stanovení síranového popela nebo celkového popela se přidá 15 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, kelímek se přikryje hodinovým sklem a mírně se zahřívá 10 min. Po ochlazení se zfiltruje bezpopelným filtrem, zbytek se promyje teplou *vodou R* až do neutrální reakce filtrátu. Filtrační papír se v kelímku vysuší, spálí a po vychladnutí v exsikátoru zváží. Rozdíl mezi dvěmi po sobě následujícími váženími je nejvýše 1 mg.

2.8.2 Cizí příměsi

Rostlinné drogy jsou prosté plísní, hmyzu a ostatních živočišných kontaminantů.
Podíl cizí příměsi je nejvýše 2 % (*m/m*), není-li uvedeno jinak.
Cizí příměs je látka popsaná v jednom nebo obou odstavcích uvedených níže:

1. *jiné části matečné rostliny* - tzn. ty části matečné rostliny, které nejsou uvedeny v popisu,
2. *cizí příměsi* - látky rostlinného nebo minerálního původu, ne však části matečné rostliny.

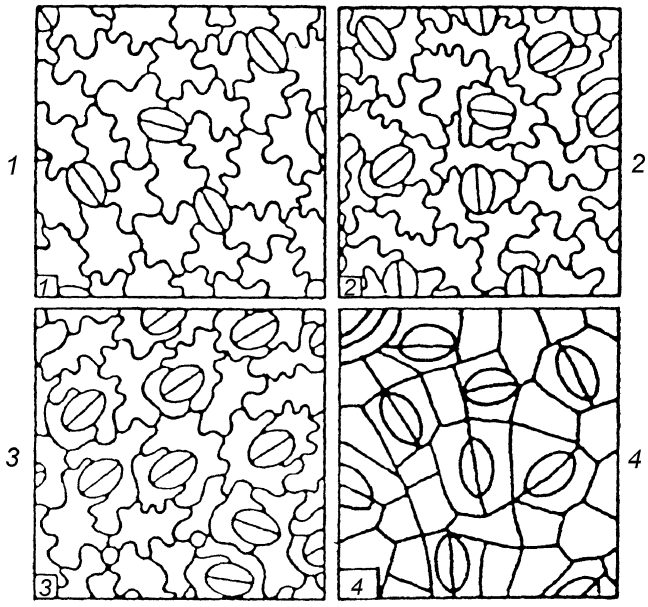
Stanovení cizí příměsi

Odváží se 100 g až 500 g zkoušené látky nebo nejmenší množství uvedené v jednotlivých monografiích. Vzorek se rozprostře do tenké vrstvy. Cizí příměsi se identifikují prostým okem nebo s použitím lupy (6x). Cizí příměsi se oddělí, zváží a jejich množství se vyjádří v procentech.

2.8.3 Stomata (průduchy) a stomatální index

Stomata (průduchy)

Obvyklé typy průduchů, viz obrázek 2.8.3-1, se rozlišují podle tvaru a uspořádání vedlejších buněk:



Obr. 2.8.3-1

1. typ *anomocytický*: průduch je obklopen proměnlivým počtem buněk, které se tvarem a velikostí neliší od buněk pokožky,
2. typ *anizocytický*: průduch je obklopen obvykle třemi vedlejšími buňkami, z nichž jedna je výrazně menší než druhé dvě,

3. typ *diacytický*: průduch je obklopen dvěma vedlejšími buňkami, svěrací štěrbina průduchu leží kolmo na společnou stěnu obou buněk,
4. typ *paracytický*: průduch je na každé straně obklopen jednou nebo více vedlejšími buňkami, jejich podélná osa je rovnoběžná se svěrací štěrbinou.

Stomatální index

Stomatální index se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100 \cdot S}{E + S},$$

v němž značí:
S - počet průduchů na dané ploše listu,
E - počet pokožkových buněk, včetně chlupů, na téže listové ploše.
Stanovení se provádí pro každý vzorek listu nejméně desetkrát a vypočítá se průměrná hodnota.

2.8.4 Číslo bobtnavosti

Je vyjádřeno objemem v mililitrech, který zaujme 1 gram drogy spolu s ulpívajícím slizem po nabobtnání ve vodě po 4 h.

1,0 g drogy, celé nebo rozdrobněné podle požadavků uvedených v jednotlivých článcích, se převede do odměrného válce na 25 ml se zabroušenou zátkou o výšce 125 ± 5 mm a děleném po 0,5 ml. Není-li předepsáno jinak, navlhčí se droga 1,0 ml *lihu 96% R*, přidá se 25 ml *vody R* a válec se uzavře. Během první hodiny se intenzivně protřepává vždy po 10 minutách, pak se nechá stát 3 h. Po 90 min od začátku zkoušky je již většina kapaliny vázána na drogu. Částice drogy ulpívající na hladině se odstraní mírným vertikálním krouživým pohybem válce. Odečte se objem, který zaujímá droga spolu s ulpívajícím slizem. Provádí se tři paralelní stanovení.

Číslo bobtnavosti je vyjádřeno průměrem ze tří paralelních stanovení.

2.8.5 Voda v silicích

10 kapek silice se smíchá s 1 ml *sirouhlíku R;* roztok je čirý.

2.8.6 Cizí estery v silicích

1 ml silice se smíchá se 3 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* v *lihu 96% R* (100 g/l) a zahřívá se 2 min na vodní lázni; do 30 min ani po ochlazení nevznikají krystaly.

2.8.7 Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích

Kapka silice se kápne na filtrační papír; nechá se 24 h volně na vzduchu; na filtračním papíru nezůstane průsvitná nebo mastná stopa.

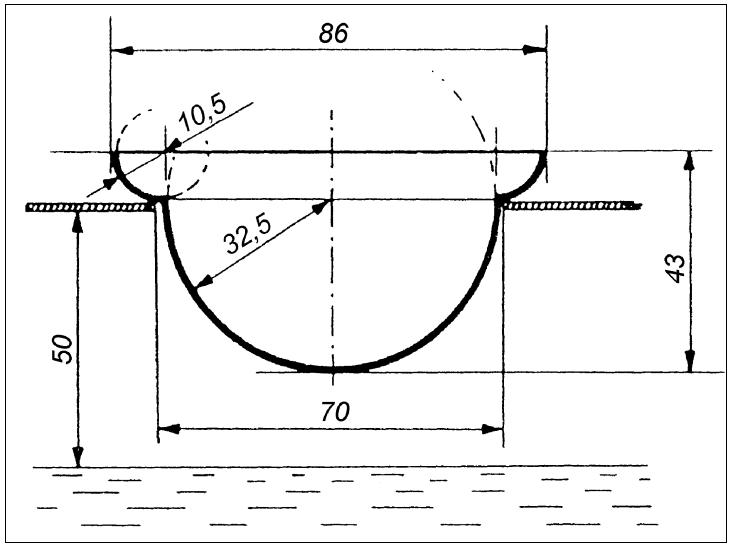
2.8.8 Pach a chuť silic

Tři kapky silice se smíchají s 5 ml *lihu* 90% *(V/V) R* a směs se rozetře s 10 g *sacharosy R*. Pach i chuť jsou stejné jako u matečné rostliny nebo jejích částí, z nichž se silice získává.

2.8.9 Zbytek po odpaření silic

Je to procento hmotnosti silice, které zbývá po odpaření na vodní lázni za podmínek níže uvedených.

Přístroj, viz obrázek 2.8.9-1 se skládá z:
- vodní lázně s víkem s otvory o průměru 70 mm,
- odpařovací misky z tepelně odolného inertního skla,
- exsikátoru.



Obr. 2.8.9-1
Rozměry v milimetrech

Pracovní postup. Odpařovací miska se zahřívá 1 h na vodní lázni a po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Do vysušené odpařovací misky se převede 5,00 g silice, není-li jinak předepsáno, a za ochrany před proudícím vzduchem se zahřívá předepsaný čas na vroucí vodní lázni; po vychladnutí v exsikátoru se zváží.

Během prováděné zkoušky se hladina vody ve vodní lázni udržuje asi 50 mm pod úrovní víka vodní lázně.

2.8.10 Rozpustnost silic v lihu 96%

Do odměrného válce se zabroušenou zátkou na 25 ml až 30 ml se převede 1,0 ml silice; provádí se v termostatu při (20 ± 0,2) °C. Z byrety o objemu nejméně 20 ml se přidává do válce líh předepsané koncentrace po 0,1 ml až do úplného rozpuštění silice a pak za intenzivního protřepávání po 0,5 ml až do 20 ml. Objem spotřebovaného lihu se zaznamená v okamžiku, kdy vznikne čirý roztok. Vznikne-li zakalený nebo opalizující roztok při spotřebě nižší než 20 ml lihu, zaznamená se

spotřeba v okamžiku, kdy vznikne zákal nebo opalescence, a je-li to možné, když zákal nebo opalescence vymizí.

Nevznikne-li čirý roztok po přidání lihu předepsané koncentrace do 20 ml, provede se stanovení s následující vyšší koncentrací lihu.

Silice je hodnocena jako "*rozpustná v n nebo více objemových dílech lihu předepsané koncentrace t*", jestliže čirý roztok v *n* objemových dílech po přidání lihu až do 20 ml zůstane beze změny v porovnání s neředěnou silicí.

Silice je hodnocena jako *"rozpustná v n objemových dílech lihu předepsané koncentrace t, dalším ředěním se roztok kalí"*, jestliže čirý roztok v *n* objemových dílech se kalí po přidání n_1 objemového dílu (n_1 je méně než 20) a zůstává zakalen i po dalším přidání lihu téže koncentrace až do 20 ml.

Silice je hodnocena jako *"rozpustná v n objemových dílech lihu předepsané koncentrace t se zákalem vznikajícím mezi objemy n_1 a n_2"*, jestliže čirý roztok v *n* objemových dílech se kalí po přidání n_1 objemového dílu (n_1 je méně než 20) a zůstává zakalen i po dalším přidání n_2 objemových dílů lihu téže koncentrace (n_2 je méně než 20). Po dalším přidání lihu do 20 ml vznikne čirý roztok.

Silice je hodnocena jako *"rozpustná, roztok opalizuje"*; jestliže lihový roztok silice je namodralý tak, jako čerstvě připravený porovnávací roztok.

Porovnávací roztok. 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS2* se smíchá s 0,05 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se roztokem *chloridu sodného R* (12 mg/l) na 50 ml; nechá se stát 5 min v temnu.

2.8.11 Stanovení cineolu v silicích

3,00 g silice předem vysušené *síranem sodným bezvodým R* se odváží do suché zkumavky a přidá se 2,10 g *kresolu R* taveného. Zkumavka se upevní do přístroje na stanovení teploty tuhnutí *(2.2.18)*, během chlazení se nepřetržitě míchá. V průběhu krystalizace dochází k pomalému vzestupu teploty. Zaznamená se nejvyšší dosažená teplota *(t_1)*.

Směs se znovu roztaví na vodní lázni při teplotě nepřevyšující teplotu t_1 o více než 5 °C a zkumavka se umístí do přístroje nastaveného na teplotu o 5 °C nižší než t_1. Míchá se nepřetržitě od okamžiku, kdy začíná probíhat krystalizace, nebo je-li teplota směsi nižší o 3 °C než t_1. Zaznamená se nejvyšší teplota, při níž směs krystalizuje *(t_2)*.

Opakuje se tak dlouho, až rozdíl mezi dvěma hodnotami t_2 je nejvýše 0,2 °C. Dojde-li k přechlazení, vyvolá se krystalizace přidáním malého krystalku směsi složené ze 3,00 g *cineolu R* a 2,10 g *kresolu R* taveného. Jestliže je t_2 nižší než 27,4 °C, opakuje se stanovení s 5,10 g směsi.

Obsah cineolu odpovídající nejvyšší nalezené teplotě *(t_2)* je uveden v tabulce 2.8.11-1.

Jestliže bylo použito 5,10 g směsi, vypočítá se obsah cineolu v procentech *m/m* ze vzorce:

$$2\,(A - 50)\,,$$

v němž značí:

A - hodnotu nalezenou v tabulce.

Je-li třeba, vypočítá se obsah cineolu odpovídající nejvyšší nalezené teplotě *(t_2)* interpolací.

Tab. 2.8.11-1

t_2 °C	Cineol obsah v procentech *m/m*	t_2 °C	Cineol obsah v procentech *m/m*
24	45,5	40	67,0
25	47,0	41	68,5
26	48,5	42	70,0
27	49,5	43	72,5
28	50,5	44	74,0
29	52,0	45	76,0
30	53,5	46	78,0
31	54,5	47	80,0
32	56,0	48	82,0
33	57,0	49	84,0
34	58,5	50	86,0
35	60,0	51	88,5
36	61,0	52	91,0
37	62,5	53	93,5
38	63,5	54	96,0
39	65,0	55	99,0

2.8.12 Stanovení silic v rostlinných drogách

Stanovení obsahu silic v rostlinných drogách se provádí destilací s vodní párou na zvláštním přístroji za podmínek uvedených níže. Destilát se jímá v kalibrované trubici, silice je zachycována v xylenu; vodná fáze se automaticky vrací zpět do destilační baňky.

Přístroj. Přístroj se skládá z následujících částí:

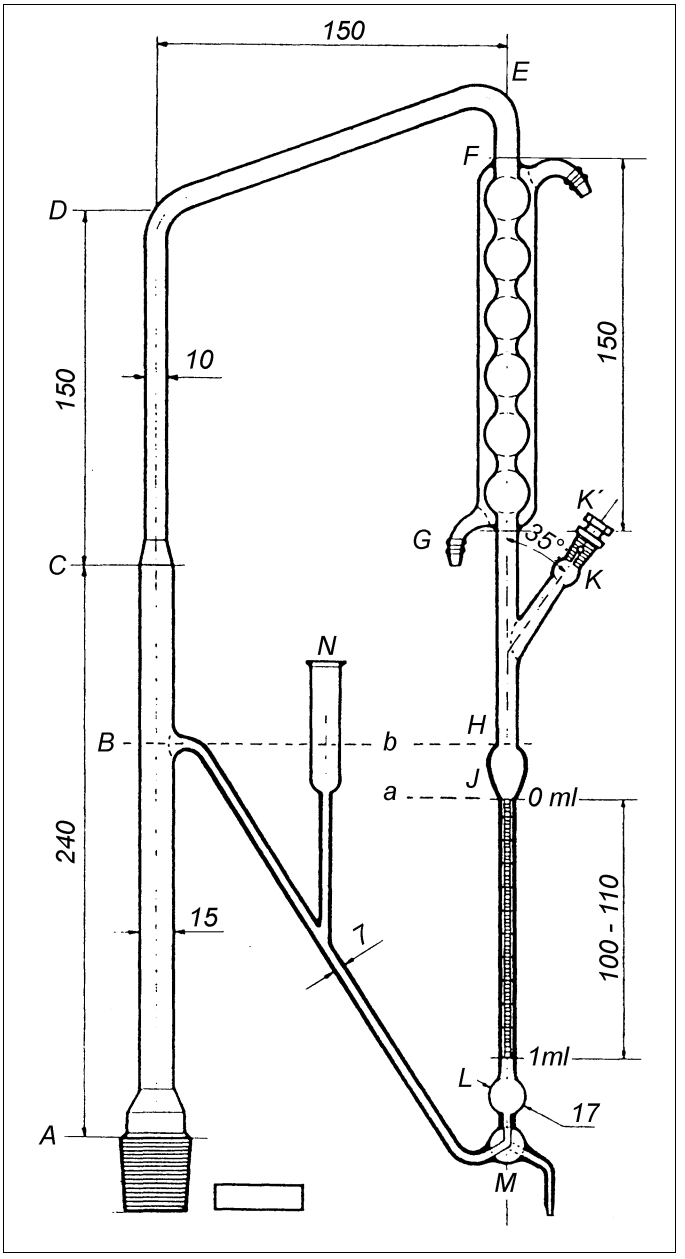
a) vhodné destilační baňky s kulatým dnem a krátkým hrdlem, na širším konci o vnitřním průměru 29 mm,
b) kondenzační části (viz obrázek 2.8.12-1), která přiléhá k destilační baňce zábrusem tak, že spolu tvoří jednolitý celek; použité sklo má nízký koeficient roztažnosti; zátka *K′* je odvětrávací, trubice *K* má otvor o průměru 1 mm, shodný s odvětrávacím otvorem zátky; širší konec trubice *K* o vnitřním průměru 10 mm je z matového skla; hruškovitě rozšířená část *J* o objemu 3 ml; trubice *JL* je dělena po 0,01 ml; kulovitá část *L* o objemu asi 2 ml; trojcestný kohout *M*; ústí trubice *B* je o 20 mm výše než horní značka dělení na trubici,
c) vhodného tepelného zdroje umožňujícího přesné nastavení teploty,
d) stojanu s kruhem pokrytým izolačním materiálem.

Postup. Použije se důkladně vyčištěný přístroj. Stanovení se provádí podle charakteru zkoušené drogy. Do destilační baňky se převede předepsané množství destilační kapaliny, přidá se několik kousků porézního porcelánu a připojí se kondenzační část. Nálevkou *N* se vlije do přístroje *voda R* tak, aby její hladina dosáhla bodu *B*. Vyjme se zátka *K′* a pipetou, jejíž konec se dotýká spodní části trubice *K*, se přidá předepsané množství *xylenu R*. Zátka *K′* se uzavře; otvor v zátce odpovídá polohou otvoru v trubici *K*. Kapalina v baňce se zahřeje k varu, a není-li jinak předepsáno, destiluje se rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min.

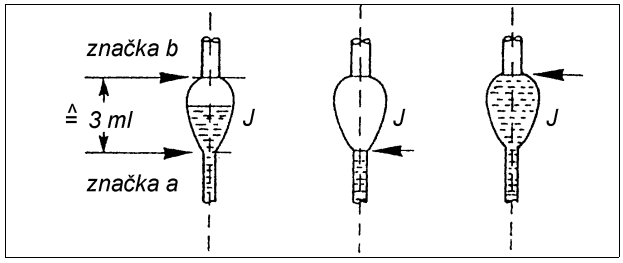
Určí se destilační rychlost; během destilace se sníží pomocí trojcestného kohoutu hladina kapaliny tak, aby odpovídala polohou spodní značce (a) (viz obrázek 2.8.12-2). Kohout se uzavře a změří se čas potřebný k tomu, aby hladina dosáhla horní značky (b). Kohout se otevře a pokračuje se v destilaci, destilační rychlost se upraví vhodným zahříváním. Destiluje se 30 min. Pak se zahřívání přeruší a po nejméně 10 min se odečte objem xylenu v dělené trubici.

Do baňky se převede předepsané množství drogy a pokračuje se v destilaci výše uvedeným způsobem po předepsanou dobu a předepsanou rychlostí. Pak se zahřívání ukončí a po 10 min se odečte objem kapaliny v dělené trubici, od něhož se odečte dříve zaznamenaný objem xylenu. Rozdíl vyjadřuje obsah silice ve zkoušené droze. Výsledek se přepočítá na obsah mililitrů ve 100 g drogy.

Má-li být silice použita pro další analytické účely, oddělí se její bezvodá část s xylenem následujícím způsobem. Vyjme se zátka *K´* a přidá se 0,1 ml roztoku *fluoresceinu, sodné soli R* (1 g/l) a 0,5 ml *vody R*. Pomocí trojcestného kohoutu se vypustí směs xylenu a silice do kulovité části *L* a po 5 min stání se vypouští pomalu tak, až hladina klesne na úroveň kohoutu *M*. Kohout otočíme zprava doleva tak, aby vytekla voda ze spojovací trubice *BM*. Pomocí nálevky *N* promyjeme trubici *acetonem R* a malým množstvím *toluenu R*. Kohout se otočí zprava doleva a směs xylenu a silice se vypustí do vhodné baňky.



Obr. 2.8.12-1 Přístroj na stanovení silic v rostlinných drogách
Rozměry v milimetrech



Obr. 2.8.12-2

N

Hmotnost zkoušené drogy se obecně řídí, není-li uvedeno jinak, požadovaným obsahem silice v ml/kg, přepočteno na drogu vysušenou *(2.2.32)* při 100 °C až 105 °C, viz tabulka N-1.

Tab. N-1

Požadovaný obsah silice v ml/kg	Hmotnost zkoušené drogy v gramech
≤ 5,0	20,0
10,0	10,0
≥ 10,0	5,0

Není-li uvedeno jinak, upraví se zkoušená droga bezprostředně před stanovením na vhodnou velikost částic, viz tabulka N-2.

Tab. N-2

Droga (obecně)	Velikost částic, síto
květy	2800
natě	2000
oplodí, plody	
kořeny, kůry	1400

U drog upravených na menší velikost částic se úprava pro stanovení silic neprovádí.

2.8.13 Zbytky pesticidů

Pro lékopisné účely je pesticid jakákoli látka nebo směs látek určených k ochraně rostlin, likvidaci nebo regulaci jakýchkoli škůdců, nežádoucích druhů rostlin nebo živočichů působících škody nebo jinak rušících při výrobě, zpracování, skladování, dopravě nebo prodeji rostlinných drog. Tato skupina zahrnuje látky používané jako regulátory růstu, defolianty nebo desikanty aplikované na rostliny před nebo po sklizni nebo jiné látky používané k ochraně zboží před znehodnocením během skladování a dopravy.

Limity. Není-li v článku uvedeno jinak, zkoušená droga přinejmenším vyhovuje limitům uvedeným v tabulce 2.8.13-1. Limity pro pesticidy, které nejsou uvedeny v tabulce a jejichž přítomnost lze z jakéhokoliv důvodu předpokládat, se shodují s limity určenými směrnicemi Evropského společenství 76/895 a 90/642, včetně doplňků a následných změn.

Tab. 2.8.13-1

Látka	Limit (mg/kg)
alachlor	0,02
aldrin a dieldrin (součet)	0,05
azinfosmethyl	1,0
bromopropylat	3,0
chlordan (součet *cis*-, *trans*- a oxychlordanu)	0,05
chlorfenvinfos	0,5
chlorpyrifos	0,2
chlorpyrifosmethyl	0,1
cypermetrin (a izomery)	1,0
DDT (součet *p,p´*-DDT, *o,p´*-DDT, *p,p´*-DDE a *p,p´*-TDE)	1,0
deltametrin	0,5
diazinon	0,5
dichlorvos	1,0
dithiokarbamaty (jako CS_2)	2,0
endosulfan (součet izomerů a endosulfansulfatu)	3,0
endrin	0,05
ethion	2,0
fenitrothion	0,5
fenvalerat	1,5
fonofos	0,05
fozalon	0,1
heptachlor (souhrn heptachloru a heptachlorepoxidu)	0,05
hexachlorbenzen	0,1
hexachlorcyklohexan - izomery (kromě γ-zomeru)	0,3
lindan (γ-hexachlorcyklohexan)	0,6
malathion	1,0
methidathion	0,2
parathion	0,5
parathionmethyl	0,2
permetrin	1,0
piperonylbutoxid	3,0
pirimifosmethyl	4,0
pyrethriny (součet)	3,0
quintozen (součet quintozenu, pentachloranilinu a methylpentachlorfenylsulfidu)	1,0

Limity pro pesticidy, které nejsou uvedeny v tabulce 2.8.13-1 ani ve směrnici ES, se vypočítají podle vzorce:

$$\frac{ADI \,.\, M}{MDD \,.\, 100},$$

v němž značí:

ADI - povolenou denní dávku, jak je uváděna FAO-WHO, v miligramech na kilogram tělesné hmotnosti,

M - tělesnou hmotnost v kilogramech (60 kg),

MDD - denní dávku rostlinné drogy v kilogramech.

Je-li droga určena k přípravě extraktů, tinktur nebo jiných lékových forem a výrobním postupem se mění obsah pesticidů v konečných přípravcích, vypočítají se limity podle vzorce:

$$\frac{ADI \,.\, M \,.\, E}{MDD \,.\, 100},$$

v němž značí:

E - extrakční faktor pro daný výrobní postup, stanovený experimentálně.

Ve výjimečných případech mohou být schváleny i vyšší limity, zejména vyžaduje-li rostlina zvláštní způsob pěstování nebo jestliže její metabolismus nebo struktura způsobují vyšší obsah pesticidů, než je běžné.

Oprávněná autorita může připustit úplné nebo částečné vypuštění zkoušky, jestliže je přesně znám celý postup ošetřování každé šarže (druh a množství použitých pesticidů, data každého použití v průběhu pěstování a po sklizni) a může být přesně kontrolován.

Odběr vzorků. Odběr vzorků se provede podle článku N *Vzorkování drog*.

Vzorky se zkoušejí bezprostředně po odběru, aby nedošlo k možnému rozkladu zbytků pesticidů. Není-li to možné, uchovávají se vzorky ve vzduchotěsných obalech, vhodných pro uchovávání potravin, při teplotě nižší než 0 °C, chráněny před světlem.

Zkoumadla. Všechna zkoumadla a rozpouštědla jsou prostá jakýchkoli znečištěnin, zejména pesticidů, které mohou rušivě působit při zkoušení. Často je třeba používat rozpouštědla zvláštní jakosti, nebo není-li to možné, rozpouštědla čerstvě předestilovaná v celoskleněných přístrojích. Vždy musí být prováděny slepé zkoušky.

Přístroje. Přístroje a zejména laboratorní sklo se vyčistí tak, aby bylo zaručeno, že neobsahuje pesticidy; např. namočí se nejméně na 16 h do roztoku detergentu prostého fosfátů, omývá se velkým množstvím *vody destilované R* a pak se omyje acetonem a hexanem nebo heptanem.

Kvalitativní a kvantitativní zkoušení zbytků pesticidů. Použité analytické postupy jsou validovány dle platných předpisů. Zejména splňují následující požadavky:

- zvolený postup, zvláště čisticí kroky, je vhodný pro kombinaci zbytek pesticidu/zkoušená látka a není citlivý k rušivým vlivům současně extrahovaných látek; detekční a kvantitativní limity se měří pro každou zkoušenou kombinaci pesticid-matrice,
- je nalezeno 70 % až 110 % každého pesticidu,
- opakovatelnost postupu není menší než hodnoty uvedené v tabulce 2.8.13-2,
- reprodukovatelnost postupu není menší než hodnoty uvedené v tabulce 2.8.13-2,
- koncentrace zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku a nastavení přístroje jsou takové, aby odezva analytického detektoru byla lineární.

Tab. 2.8.13-2

Koncentrace pesticidu (mg/kg)	Opakovatelnost (rozptyl, ± mg/kg)	Reprodukovatelnost (rozptyl, ± mg/kg)
0,010	0,005	0,01
0,100	0,025	0,05
1,000	0,125	0,25

Následující část je uvedena pro informaci a jako návod; netvoří závaznou část obecných metod.

Zkoušení pesticidů - organochlorové, organofosfátové a pyrethroidní insekticidy

Následující postupy mohou být použity v návaznosti na Obecné metody uvedené výše. V závislosti na zkoušené látce je nezbytné upravit, někdy podstatně, postup uvedený níže. V každém případě je třeba použít navíc ještě jednu kolonu s odlišnou polaritou nebo ještě jednu detekční metodu (např. hmotnostní spektrometrie) nebo odlišný postup (např. imunochemické metody) potvrzující získané výsledky.

Postup je validován jen pro analýzu vzorků rostlinných drog obsahujících méně než 15 % vody. Vzorky s vyšším obsahem vody se usuší tak, aby nebyl významně ovlivněn obsah pesticidu.

1. Extrakce

10 g zkoušené látky hrubě práškované se smíchá se 100 ml *acetonu R* a nechá se stát 20 min. Přidá se 1 ml roztoku *karbofenothionu R* (1,8 μg/ml) v *toluenu R*. Homogenizuje se 3 min za použití vysokootáčkového přístroje. Zfiltruje se a filtr se promyje dvakrát 25 ml *acetonu R*. Filtrát a promývací tekutiny se spojí a odpaří se za sníženého tlaku při teplotě nejvýše 40 °C téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v několika mililitrech *toluenu R* a zahřívá se až do úplného odstranění acetonu. Zbytek se rozpustí v 8 ml *toluenu R*. Zfiltruje se membránovým filtrem (45 μm), baňka i filtr se promyjí *toluenem R* a zředí se jím na 10,0 ml (roztok A).

2. Čištění

a) Organochlorové, organofosfátové a pyrethroidní insekticidy

Stanoví se metodou vylučovací chromatografie *(2.2.30)*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony, délky 0,30 m a vnitřního průměru 7,8 mm, naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (5 μm),
- mobilní fáze *toluenu R* při průtokové rychlosti 1 ml/min.

Propustnost kolony. Nastříkne se 100 μl roztoku *červeně methylové R* (0,5 g/l) a *modři oracetové R* (0,5 g/l) v *toluenu R* a pokračuje se v chromatografii. Kolonu lze použít, jestliže se barva eluátu mění z oranžové na modrou při elučním objemu asi 10,3 ml. Je-li třeba, kalibruje se kolona za použití roztoku analyzovaného pesticidu s nižší molekulární hmotností (např. dichlorvos) vhodné koncentrace v *toluenu R* a pak roztoku analyzovaného pesticidu s vyšší molekulární hmotností (např. deltametrin) vhodné koncentrace v *toluenu R*. Zjistí se fáze eluátu obsahující oba insekticidy.

Čištění zkoušeného roztoku. Nastříkne se vhodný objem roztoku A (100 μl až 500 μl) a pokračuje se v chromatografii; frakce se jímají výše popsaným způsobem (roztok B). Organofosfátové insekticidy se eluují obvykle mezi 8,8 ml a 10,9 ml, organochlorové a pyrethroidní insekticidy se eluují obvykle mezi 8,5 ml a 10,3 ml.

b) Organochlorové a pyrethroidní insekticidy

Na chromatografický sloupec o délce 0,1 m a vnitřním průměru 5 mm se vloží kousek odtučněné vaty a 0,5 g silikagelu zpracovaného následujícím způsobem: *silikagel pro chromatografii R* se suší nejméně 4 h v sušárně při 150 °C. Po vychladnutí se přidává po kapkách *voda R* v množství odpovídajícím 1,5 % hmotnosti použitého silikagelu; důkladně se protřepe, až se odstraní vzniklé hrudky, a pak se protřepává 2 h na mechanické třepačce. Kolona se nastaví pomocí 1,5 ml *hexanu R*. Předplněné kolony obsahující asi 0, 50 g vhodného silikagelu mohou být použity po předchozí validaci.

Roztok B se odpaří téměř do sucha v proudu *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku prostého kyslíku R* a rozpustí se ve vhodném množství *toluenu R* (200 μl až 1 ml, v závislosti na objemu

nastříknutém při přípravě roztoku B). Roztok se přenese kvantitativně na kolonu a chromatografuje se za použití 1,8 ml *toluenu R* jako mobilní fáze, eluát se jímá (roztok C).

3. Kvantitativní analýza

a) Organofosfátové insekticidy

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *karbofenothionu R* jako vnitřního standardu. Je-li třeba, použije se druhý vnitřní standard ke zjištění možné interference s píkem odpovídajícím *karbofenothionu R*.

Zkoušený roztok. Roztok B se odpaří v proudu *helia pro chromatografii R* téměř do sucha a zředí se *toluenem R* na 100 μl.

Porovnávací roztok. Připraví se nejméně tři roztoky zkoušeného insekticidu a karbofenothionu v *toluenu R* obsahující zkoušené insekticidy a karbofenothion v koncentracích vhodných pro záznam kalibrační křivky.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm se stěnou pokrytou vázanou fází *polydimethylsiloxanu R* (tloušťka vrstvy 0,25 μm),
- *vodíku pro chromatografii R* jako nosného plynu, další plyny, jako *helium pro chromatografii R* nebo *dusík pro chromatografii R*, mohou být použity po předchozí vhodné validaci,
- fosforo-dusíkového plamenoionizačního detektoru nebo hmotnostního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 1 min na 80 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min až na 150 °C, při níž se udržuje 3 min, pak se zvyšuje rychlostí 4 °C/min až na 280 °C, při níž se udržuje 1 min,
- teploty nástřikového prostoru 250 °C a detektoru 275 °C.

Vstříkne se zvolený objem každého roztoku. Při dodržení předepsaných podmínek odpovídají relativní retenční časy přibližně hodnotám uvedeným v tabulce 2.8.13-3. Obsah každého pesticidu se vypočítá z plochy píků a koncentrací roztoků.

Tab. 2.8.13-3

Látka	Relativní retenční časy
dichlorvos	0,20
fonofos	0,50
diazinon	0,52
parathionmethyl	0,59
chlorpyrifosmethyl	0,60
pirimifosmethyl	0,66
malathion	0,67
parathion	0,69
chlorpyrifos	0,70
methidathion	0,78
ethion	0,96
karbofenothion	1,00
azinfosmethyl	1,17
fozalon	1,18

b) Organochlorové a pyrethroidní insekticidy

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *karbofenothionu R* jako vnitřního standardu. Je-li třeba, použije se druhý vnitřní standard ke zjištění možné interference s píkem odpovídajícím *karbofenothionu R*.

Zkoušený roztok. Roztok C se odpaří v proudu *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku prostého kyslíku R* téměř do sucha a zředí se *toluenem R* na 500 μl.

Porovnávací roztok. Připraví se nejméně tři roztoky zkoušeného insekticidu a karbofenothionu v *toluenu R* obsahující zkoušené insekticidy a karbofenothion v koncentracích vhodných pro záznam kalibrační křivky.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm se stěnou pokrytou vázanou fází *polydimethylsiloxanu R* (tlouštka vrstvy 0,25 μm),
- *vodíku pro chromatografii R* jako nosného plynu, další plyny, jako *helium pro chromatografii R* nebo *dusík pro chromatografii R*, mohou být použity po předchozí vhodné validaci,
- detektoru elektronového záchytu,
- zařízení umožňujícího nástřik přímo na kolonu,
- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 1 min na 80 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min až na 150 °C, při níž se udržuje 3 min, pak se zvyšuje rychlostí 4 °C/min až na 280 °C, při níž se udržuje 1 min,
- teploty nástřikového prostoru 250 °C a detektoru 275 °C.

Vstříkne se zvolený objem každého roztoku. Při dodržení předepsaných podmínek odpovídají relativní retenční časy přibližně hodnotám uvedeným v tabulce 2.8.13-4. Obsah každého pesticidu se vypočítá z plochy píků a koncentrací roztoků.

Tab. 2.8.13-4

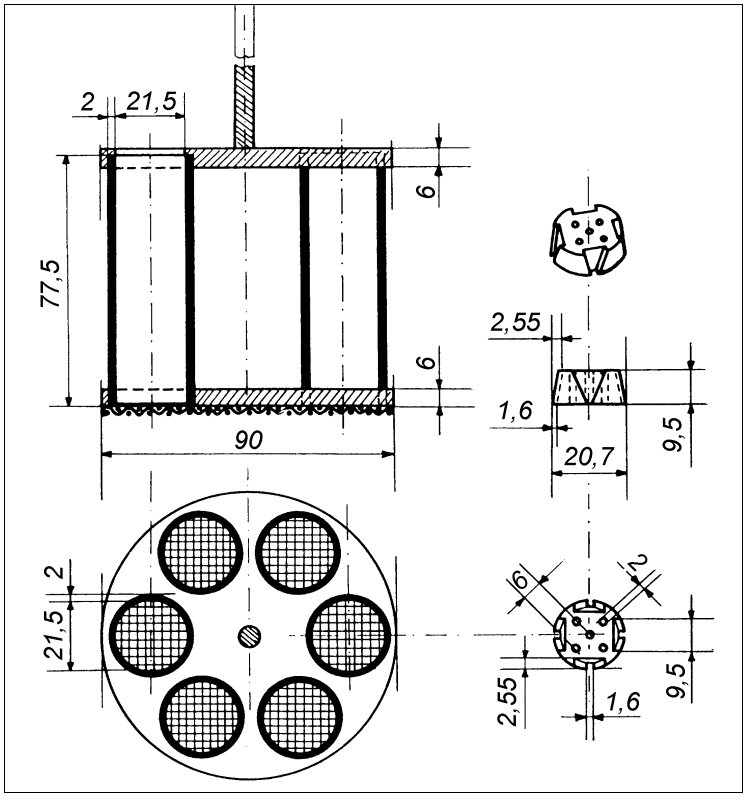
Látka	Relativní retenční časy
α-hexachlorcyklohexan	0,44
hexachlorbenzen	0,45
β-hexachlorcyklohexan	0,49
lindan	0,49
δ-hexachlorcyklohexan	0,54
∈-hexachlorcyklohexan	0,56
heptachlor	0,61
aldrin	0,68
cis-heptachlorepoxid	0,76
p,p′-DDE	0,81
α-endosulfan	0,82
dieldrin	0,87
p,p′-DDE	0,87
o,p′-DDD	0,89
endrin	0,91
β-endosulfan	0,92
o,p-DDT	0,95
karbofenothion	1,00
p,p′-DDT	1,02
cis-permetrin	1,29
trans-permetrin	1,31
cypermetrin	1,40
fenvalerat*	1,47
	1,49
deltametrin*	1,54

* Látka vykazuje několik píků.

2.9 Metody farmaceutické technologie

2.9.1 Zkouška rozpadavosti tablet a tobolek

Podstata zkoušky. Zkouškou se zjišťuje, zda se tablety nebo tobolky za níže popsaných experimentálních podmínek rozpadnou v předepsané kapalině během předepsané doby.



Obr. 2.9.1-1 Přístroj na zkoušku rozpadavosti tablet a tobolek
Rozměry v milimetrech

Přístroj. Hlavní částí přístroje (obr. 2.9.1-1) na stanovení rozpadavosti tablet a tobolek je pevný závěsný košík, v němž je ve vertikální poloze symetricky umístěno šest skleněných trubic dlouhých (77,5 ± 2,5) mm, o vnitřním průměru 21,5 mm a o tloušťce stěn asi 2 mm. Trubice jsou drženy ve vertikální poloze dvěma průhlednými plastickými deskami o průměru 90 mm a tloušťce 6 mm s šesti otvory. Otvory jsou pravidelně rozmístěny od středu desky. Dolní otvor trubic je uzavřen síťkou z nerezového drátu o průměru 0,635 mm a o velikosti ok 2,00 mm. Každá trubice je opatřena vyjímatelným válcovitým diskem o průměru (20,7 ± 0,15) mm a výšce (9,5 ± 0,15) mm vyrobeným z průhledné umělé hmoty s relativní hustotou 1,18 až 1,20. Disky mají pět otvorů o průměru 2 mm, z nichž jeden je ve středu disku a ostatní čtyři jsou rovnoměrně rozmístěny v kruhu o poloměru 6 mm od středu disku. Na obvodu disku jsou pravidelně rozmístěny 4 zářezy, hluboké 2,55 mm, u horní základny disku široké 9,5 mm a u dolní základny široké 1,6 mm. Košík je zavěšen na kovové tyčce, která se upevňuje k mechanickému zařízení. Ta zabezpečuje pohyb košíku

ve vertikální poloze stálou frekvencí 28 až 32 zdvihu/min při výšce zdvihu 50 mm až 60 mm. Košík se vkládá do vhodné nádoby, většinou do kádinky na objem 1000 ml. Objem kapaliny je takový, že pokud je zařízení v horní úvrati, je drátěná síťka alespoň 15 mm pod hladinou kapaliny, a je-li zařízení v dolní úvrati, je drátěná síťka alespoň 25 mm nad dnem kádinky a horní otevřené konce trubic zůstávají pod povrchem kapaliny. Tekutina je vytemperována na teplotu 36 °C až 38 °C.

Provedení závěsného košíku může být různé při zachování parametrů skleněných trubic a drátěné síťky.

Postup zkoušky. Do každé ze šesti trubic se vloží jedna tableta nebo tobolka, je-li předepsáno, použije se disk. Závěsný košík se umístí do kádinky obsahující předepsanou tekutinu.

Přístroj se uvede do chodu na předepsanou dobu a poté se kontroluje stav tablet nebo tobolek.

Hodnocení. Vzorek vyhovuje zkoušce, jestliže se rozpadly všechny tobolky nebo tablety. Tableta nebo tobolka se pokládá za rozpadlou, jestliže

a) na síťce nezůstal žádný zbytek nebo
b) zůstal zde měkký zbytek bez tvrdého nezvlhčeného jádra nebo
c) na síťce nebo přilepené ke spodní části disku zůstaly úlomky obalu obalovaných tablet, příp. úlomky tobolek.

2.9.2 Zkouška rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků

Podstata zkoušky. Zkouškou se zjišťuje, zda rektální přípravek (čípek, tobolka) nebo vaginální přípravek (globule, tobolka, tableta) umístěný v tekutém prostředí za níže popsaných podmínek se rozpadne nebo změkne během předepsané doby.

Přístroj. Přístroj (obr. 2.9.2-1) je tvořen trubicí ze skla nebo vhodné plastické průhledné hmoty vhodné tloušťky, na níž se uvnitř připevňuje třemi úchytkami kovová část skládající se ze dvou děrovaných disků z nerezavějícího kovu. Každý disk, jehož průměr (50 mm) je prakticky shodný s vnitřním průměrem trubice, má 39 otvorů o průměru 4 mm. Disky jsou od sebe vzdáleny přibližně 30 mm. Ke zkoušce se použijí tři přístroje, z nichž každý obsahuje jednu jednotku zkoušené lékové formy. Každý přístroj je umístěn v nádobě o minimálním objemu 4 l nebo všechny tři přístroje jsou umístěny v nádobě o minimálním objemu 12 l. Nádoba je naplněna vodou temperovanou na teplotu 36 °C až 37 °C, pokud není předepsáno jinak. Nádoba je vybavena pomaloběžným míchadlem a držákem, který udržuje trubice ve svislé poloze 90 mm pod hladinou vody a umožňuje jejich převrácení bez vynoření z vody.

Postup. Zkouší se tři jednotky sledované lékové formy. Každá jednotka se umístí na spodní disk kovové části, která se upevní do trubice. Přístroje se každých 10 min obrátí a po uplynutí předepsané doby se hodnotí rozpad jednotlivých jednotek zkoušené lékové formy. Rozpad zkoušené lékové formy je vyhovující, jestliže se všechny tři jednotky rozpadly nebo změkly.

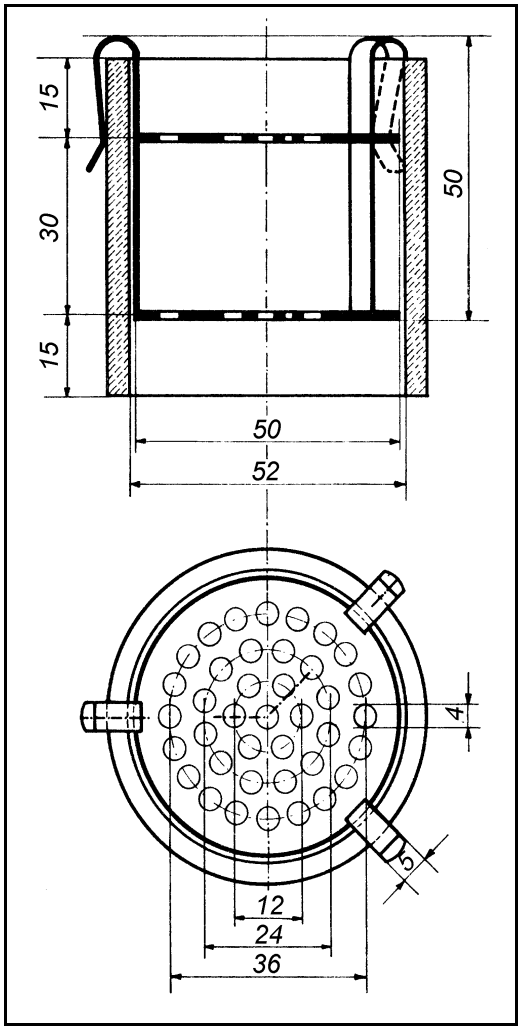
Hodnocení. Rozpadu je dosaženo, jestliže:

a) přípravek se rozpustil,
b) složky přípravku se oddělily. Roztavené hydrofobní složky se hromadí na hladině kapaliny, nerozpustné tuhé složky klesají ke dnu a rozpustné složky se rozpouštějí. Podle typu přípravku se mohou složky rozdělit jedním nebo více uvedenými způsoby,
c) nastalo změknutí přípravku, které může být provázeno patrnou změnou tvaru bez úplného rozdělení složek. U zkoušené jednotky lékové formy nesmí zůstat pevné jádro, které klade odpor tlaku skleněné tyčinky,
d) došlo u želatinových tobolek k uvolnění jejich obsahu,

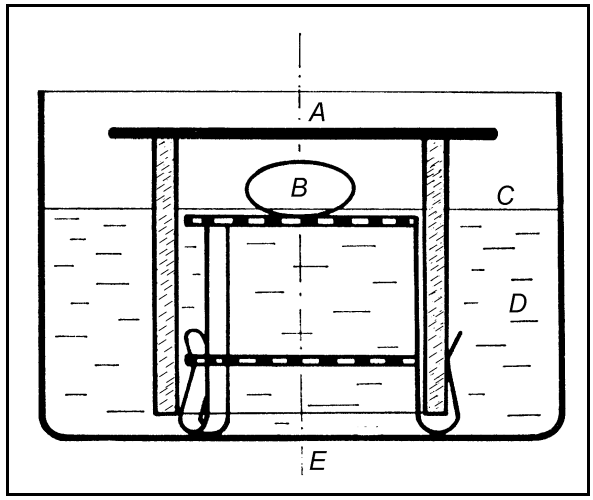
e) na disku nezůstal žádný zbytek tablety nebo byl tento zbytek tvořen pouze měkkou nebo pěnovou hmotou bez pevného jádra kladoucího odpor tlaku skleněné tyčinky.

Zkouška rozpadavosti vaginálních tablet

Použije se kovová část výše popsaného přístroje, která se postaví na úchytky disků do nádoby vhodného průměru obsahující vodu temperovanou na teplotu 36 °C až 37 °C. Hladina vody se astaví těsně pod horní disk a pipetou se zvýší tak, aby se vytvořila souvislá tenká vrstva pokrývající otvory horního disku (obr. 2.9.2-2). Zkouška se provede se třemi jednotkami zkoušených vaginálních tablet jednotlivě. Každá jednotka se umístí na horní disk a přístroj se překryje skleněnou deskou, aby byla dosažena vhodná vlhkost. Po uplynutí předepsané doby se hodnotí rozpad zkoušených jednotek. Rozpad zkoušených vaginálních tablet vyhovuje, jestliže se všechny tři jednotky rozpadly nebo změkly.



Obr. 2.9.2-1 Přístroj pro stanovení rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků
Rozměry v milimetrech



Obr. 2.9.2-2

A skleněná deska
B vaginální tablety
C hladina vody
D voda
E nádoba

N

Stanovení doby úplné deformace hydrofobních čípků

Podstata zkoušky. Hydrofobní čípek zahřátý na stanovenou teplotu je deformován závažím předepsané hmotnosti a tvaru. Měří se čas potřebný k sestupu použitého závaží po dráze odpovídající délce čípku zmenšené o 0,5 mm.

Přístroj. Přístroj se skládá ze skleněné trubice 200 mm dlouhé o vnitřním průměru 26 mm a na dolním konci uzavřené zátkou, v níž je otvor o průměru 3 mm. V trubici je umístěna 50 mm od jejího dolního okraje kovová válcovitá vložka vysoká 20 mm o průměru 25 mm s pěti rovnoběžnými průchody o průměru 2 mm. Jeden prochází osou válcovité vložky a čtyři další souměrně poblíž jejího obvodu. Uprostřed horní kruhové základny válcovité vložky je vyhloubení 5 mm ve tvaru špičky čípku. Trubice s teploměrem děleným po 0,1 °C se upevní ve skleněné válcovité nádobě dlouhé 225 mm o průměru 50 mm, která má na spodním konci přívod a na horním konci odvod vody vyhřívané na (37 ± 0,5) °C pomocí ultratermostatu. V trubici je kovová tyčinka asi 140 mm dlouhá o průměru 7 mm na spodním konci válcovitě rozšířená na průměr 15 mm. Celá tyčinka váží 30,0 g. Uprostřed rozšíření je ve směru podélné osy zapuštěna jehla dlouhá 3 mm. Válcovité rozšíření má 20 mm od svého dolního okraje tři výčnělky, které směřují souměrně do stran. Podobné výčnělky jsou i na vlastní tyčince ve vzdálenosti 100 mm od dolního okraje válcovitého rozšíření. Výčnělky jsou tak dlouhé, že udržují tyčinku po jejím zasunutí do trubice ve svislé poloze, ale nebrání jejímu volnému pohybu v trubici.

Postup zkoušky. Nejprve se přístroj vyhřeje na (37 ± 0,5) °C, pak se při pokojové teplotě nabodne zkoušený čípek na jehlu tyčinky ve středu kruhové základny. Jehlu je možno předem přiměřeně nahřát, aby se čípek neroztrhl. Potom se tyčinka s čípkem opatrně vloží do trubice tak, aby jeho špička zapadla do vyhloubení válcovité vložky, a v témž okamžiku se spustí stopky. Jakmile klesne spodní plocha válcovitého rozšíření tyčinky 0,5 mm nad horní plochu válcovité vložky, a v okamžiku, kdy se zářez na tyčince kryje s horním okrajem trubice, zastaví se stopky a zaznamená se čas. Odečtená hodnota je dobou úplné deformace. Stanovení se provede u pěti čípků a ze zjištěných hodnot se vypočítá průměrná doba úplné deformace.

Hodnocení. Doba úplné deformace jednotlivých čípků se neliší od zjištěné průměrné doby úplné deformace o více než ± 10 %. Doporučená doba úplné deformace pro čípky s hmotností do 2,5 g je 15 min a pro čípky o větší hmotnosti než 2,5 g je 20 min, není-li předepsáno a schváleno jinak, zejména pro čípky s větším rozdílem hmotnosti od 2,5 g.

2.9.3 Zkouška disoluce pevných lékových forem

Podstata zkoušky

Zkouškou disoluce se stanoví množství uvolněné léčivé látky z pevné lékové formy (např. tablet, tobolek a čípků) v předepsané kapalině a v předepsaném čase.

Není-li předepsána a schválena určitá metoda, lze použít přístroje s míchadly nebo přístroje s košíčky nebo přístroje s průtokovou celou.

Pro každý léčivý přípravek, u něhož je předepsána zkouška disoluce, jsou stanoveny následující podmínky k provedení zkoušky:

- přístroj, který má být použit; pokud je ve výjimečných případech použit přístroj s průtokovou celou, je nutno uvést typ použité cely (obr. 2.9.3-4 až 2.9.3-6),
- složení, objem a teplota disoluční kapaliny,
- počet otáček, případně průtoková rychlost disoluční kapaliny,
- čas, způsob a množství odebraného roztoku ke stanovení obsahu účinné látky, případně podmínky pro automatické vyhodnocování,

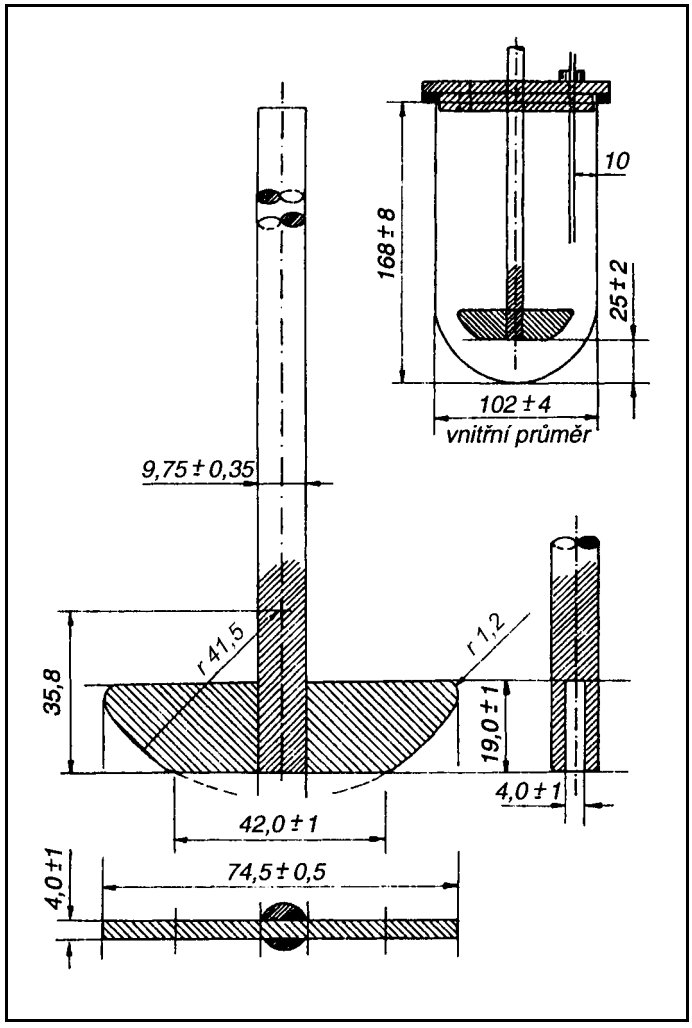
- metoda stanovení obsahu účinné látky,
- hodnocení disoluce přípravku v předepsaném čase.

Přístroje

Všechny části přístroje, které přicházejí do styku s přípravkem nebo disoluční kapalinou, jsou chemicky inertní, a tedy neadsorbují hodnocené látky, nereagují ani neinterferují se zkoušeným vzorkem. Všechny kovové části přístroje, které přicházejí do styku s přípravkem nebo disoluční kapalinou, jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo chráněny vhodným inertním materiálem, který zamezí reakci nebo interferenci s přípravkem nebo disoluční kapalinou. Žádná část přístroje nebo jeho příslušenství nevykazuje vibrace nebo výkyvy, rotace hnací hřídele a průtok celou jsou plynulé.

Přístroj ke zkoušce se vybírá podle fyzikálně-chemických charakteristik zkoušené lékové formy.

Přednostně je vhodné použít přístroj, který umožňuje pozorování přípravku a míchání během zkoušky.



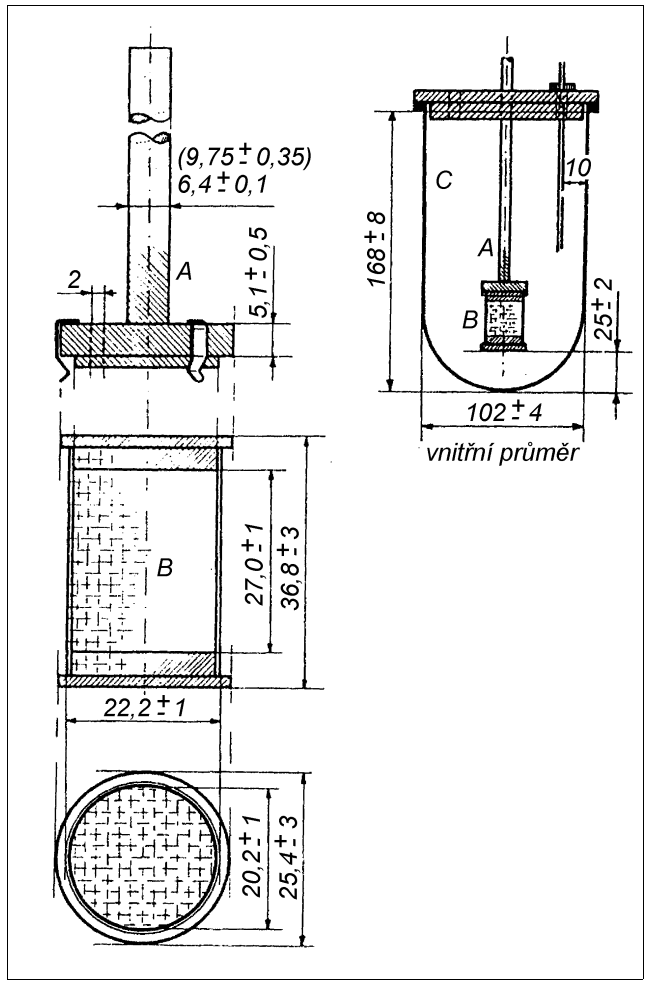
Obr. 2.9.3-1 Přístroj s míchadlem
Rozměry v milimetrech

Přístroj s míchadly. Přístroj (obr. 2.9.3-1) se skládá:

- z válcovité nádoby s kulatým dnem z borosilikátového skla nebo jiného inertního průhledného materiálu o objemu 1000 ml; nádoba má víko k zamezení odpařování; ve víku je středový otvor pro hnací hřídel, otvor pro teploměr a otvor pro odběr a přidávání disoluční kapaliny,
- z míchadla sestávajícího z hnací hřídele a dvou lopatek na jejím spodním konci; lopatky míchadla jsou umístěny na hřídeli tak, že spodní okraj lopatek prochází přesně spodním koncem hřídele; hnací hřídel musí být vystředěna, s maximální povolenou výchylkou 2,0 mm od středové osy nádoby, a její spodní konec s lopatkami musí být umístěn ve vzdálenosti (25 ± 2) mm od dna nádoby po dobu zkoušky; horní konec hřídele je připojen k motorové jednotce s regulací otáček; míchání musí být plynulé bez znatelného chvění,
- z vodní lázně zaručující během celé zkoušky teplotu disoluční tekutiny (37 ± 0,5) °C.

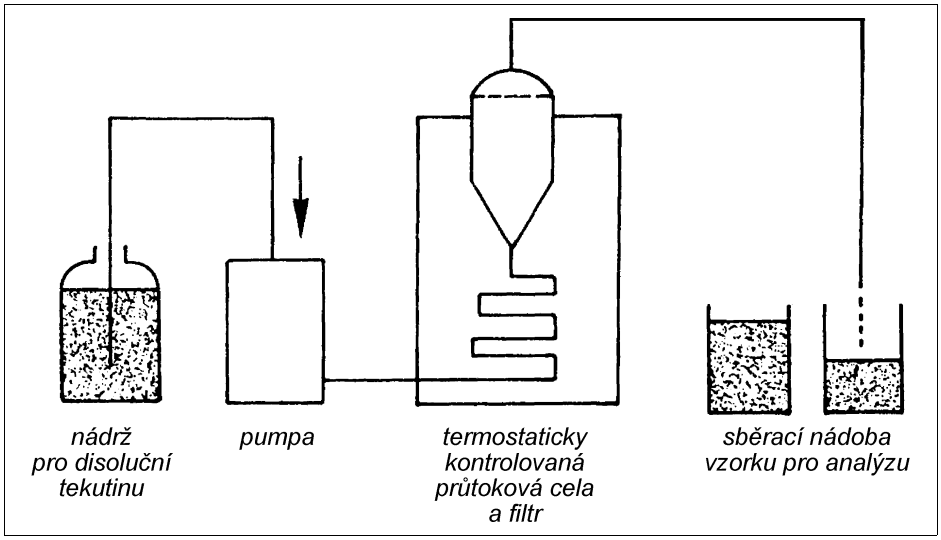
Přístroj s košíčky. Přístroj (obr. 2.9.3-2) se skládá:

- z válcovité nádoby popsané u přístroje s míchadly,
- z hnací hřídele, která je na spodním konci zakončená válcovitým košíčkem; košíček tvoří dvě části: horní příruba, která je na konci hnací hřídele a je opatřena jedním otvorem o průměru 2,0 mm. Pomocí tří pružných per nebo jiným vhodným způsobem se k horní přírubě připevňuje tubus košíčku, do kterého se umísťuje zkoušený přípravek. Upevnění tubusu musí být natolik pevné, aby během rotace nedocházelo k jeho vychýlení od středové osy nádoby; tubus košíčku je tvořen síťkou válcovitého tvaru zasazenou nahoře i dole do úzkých kovových prstenců; jestliže není předepsáno jinak, je síťka tvořena drátem o průměru 0,254 mm a čtverhrannými otvory o rozměru 0,381 mm; pro práce ve zředěných kyselinách může být použito košíčků pozlacených vrstvou 2,5 μm silnou; dno košíčku je umístěno po dobu zkoušky (25 ± 2) mm ode dna nádoby; horní konec hřídele je připojen k motorové jednotce s regulací otáček; rotace musí být plynulá bez znatelného chvění,
- z vodní lázně zaručující během celé zkoušky teplotu disoluční tekutiny (37 ± 0,5) °C.



Obr. 2.9.3-2 Přístroj s košíčkem
Rozměry v milimetrech

Přístroj s průtokovou celou. Přístroj (obr. 2.9.3-3) se skládá:
- ze zásobní nádoby na disoluční tekutinu,
- z pumpy, která vytlačí disoluční tekutinu nahoru přes průtokovu celu,
- z průtokové cely (viz obr. 2.9.3-4 až 2.9.3-6) z průhledného materiálu umístěné vertikálně s filtračním zařízením zamezujícím průtoku nerozpuštěných částic. Průtoková cela, viz obr. 2.9.3-6, je určena pro lipofilní lékové formy, jako jsou některé čípky a měkké želatinové tobolky. Celá se skládá ze tří vzájemně spojitelných, průhledných částí. Dolní část (1) obsahuje dvě sousedící komůrky napojené na průtokové zařízení. Disoluční kapalina protéká přes komůrku A a jejím vrchem přetéká do komůrky B, kde stéká do otvoru o malé světlosti, a odtud proudí opět vzhůru k filtračnímu zařízení. Ve střední části cely (2) je dutina určená k hromadění lipofilních pomocných látek, které plavou na vlastní disoluční kapalině. Kovová mřížka je hrubým filtrem. Horní část cely (3) obsahuje filtrační jednotku pro filtry papírové, ze skleněných vláken nebo celulosy,
- z vodní lázně, udržující během celé zkoušky teplotu disoluční kapaliny (37 ± 0,5) °C.



Obr. 2.9.3-3 Přístroj s průtokovou celou

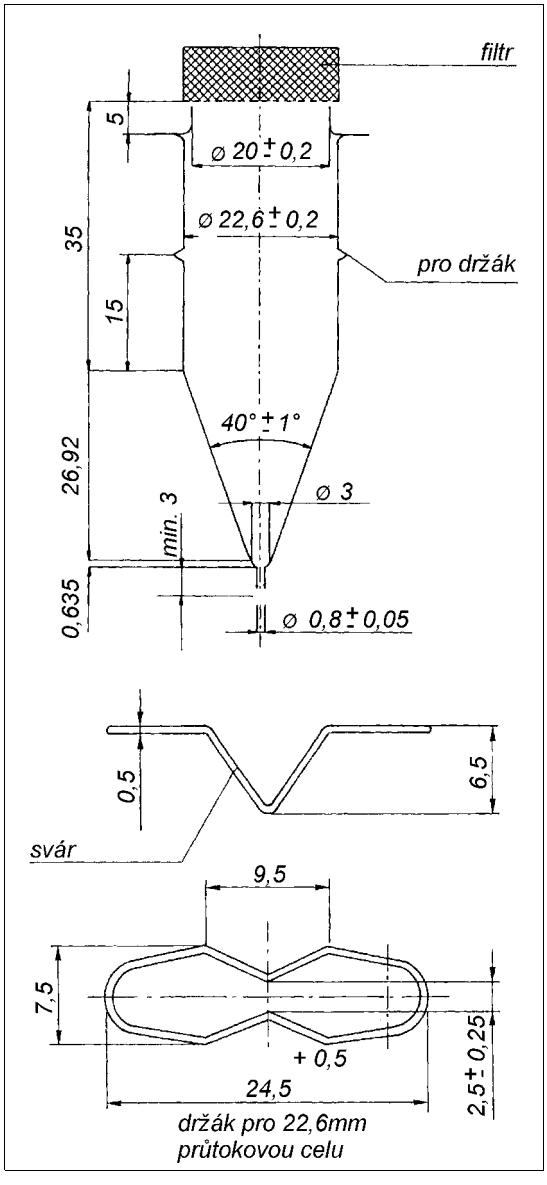
Disoluční kapalina. Jestliže disoluční kapalinou je tlumivý roztok, jeho pH se upravuje v rozmezí ±0,05 jednotek od předepsané hodnoty. Před zkouškou je třeba z disoluční kapaliny odstranit rozpuštěné plyny, které by mohly být příčinou bublinek uvolňujících se během zkoušky a ovlivňujících její průběh a výsledky.

Postup zkoušky

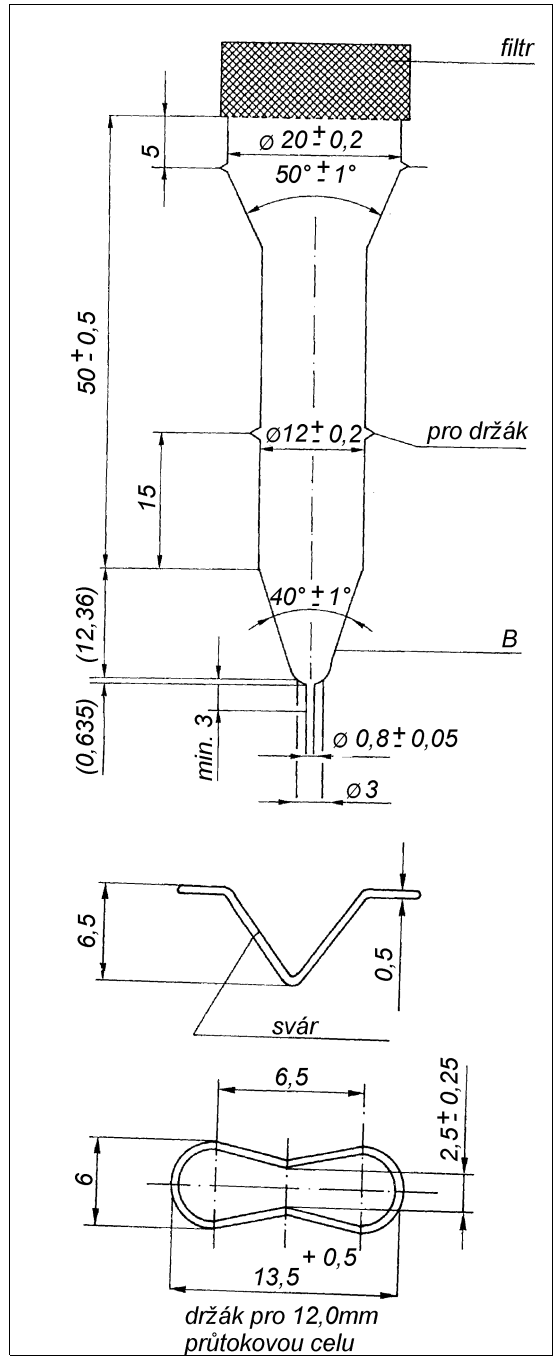
Způsob míchadlový a košíčkový. Předepsané množství disoluční kapaliny se odměří do nádoby, sestaví se přístroj, disoluční kapalina se vytemperuje na (37 ± 0,5) °C a odstraní se teploměr.

Pro způsob míchadlový: Jednotka zkoušeného přípravku se vloží na dno nádoby před spuštěním přístroje; přípravky, které plavou nebo se vznášejí v disoluční kapalině se přidrží vodorovně u dna za použití vhodné pomůcky, jako je spirálka z drátu nebo skla.

Pro způsob košíčkový: Jednotka zkoušeného přípravku se vloží do suchého košíčku, který se upevní na hnací hřídel. Je třeba se pečlivě vyhnout vzduchovým bublinkám na povrchu zkoušeného přípravku. Otáčky přístroje se nastaví na předepsaný počet (s přesností ±4 %) a přístroj se ihned uvede do chodu.



Obr. 2.9.3-4 Průtoková cela
Rozměry v milimetrech

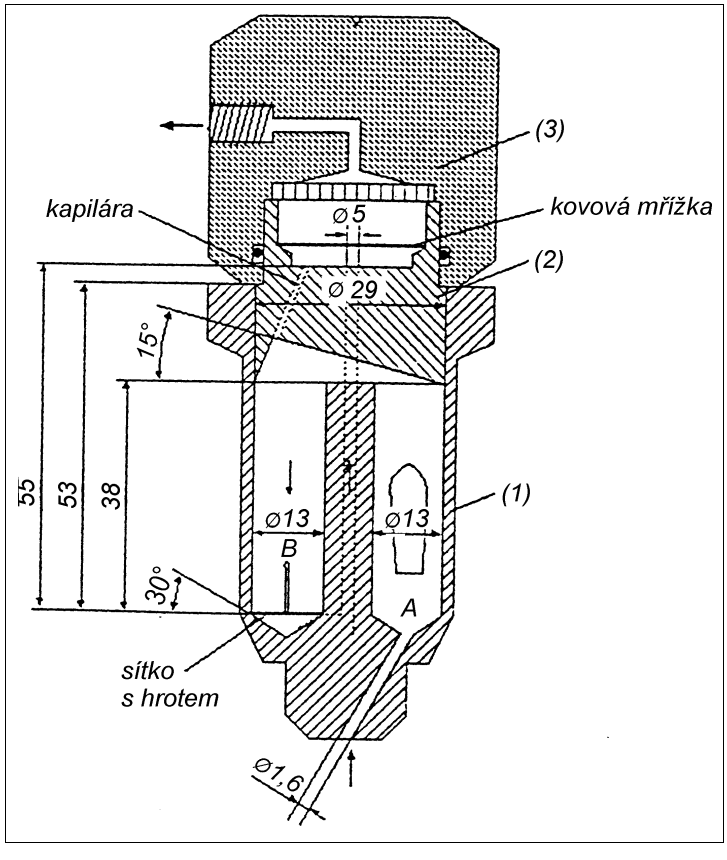


Obr. 2.9.3-5 Průtoková cela
Rozměry v milimetrech

Způsob průtokový. Cela, viz obr. 2.9.3-4 a 2.9.3-5. Do kuželového dna cely se umístí jedna skleněná kulička o průměru (5 ± 0,5) mm k och-raně vstupu disoluční kapaliny do cely a pak dal ší skleněné kuličky vhodného rozměru, nejlépe o průměru (1 ± 0,1) mm. Do cely nebo do vrstvy kuliček se umístí jednotka zkoušeného přípravku a zatíží se držákem. K cele se připojí víko cely, v němž je umístěno filtrační zařízení. Za použití vhodného čerpadla se disoluční kapalina o teplotě (37 ± 0,5) °C nechá rovnoměrně proudit přes dno cely předepsanou rychlostí (±5 %).

Cela, viz obr. 2.9.3-6. Jednotka zkoušeného přípravku se umístí do komůrky A. Cela se zkompletuje a uzavře horní částí s filtrem. Na začátku zkoušky je třeba odstranit vzduch z komůrky A přes malý otvor vedoucí k filtračnímu zařízení. Disoluční kapalina se zahřeje na vhodnou teplotu vzhledem k teplotě tání přípravku. Za použití vhodného čerpadla vtéká ohřátá disoluční kapalina dnem cely předepsanou rychlostí (±5 %). Disoluční kapalina pak přetéká do komůrky B, vzduch uniká kapilárou a komůrka B se plní kapalinou. Přípravek se rozpadá v disolučním médiu podle svých fyzikálně-chemických vlastností.

V předepsaných a schválených případech u velkoobjemových čípků lze k disoluční zkoušce použít jejich reprezentativní úlomky.



Obr. 2.9.3-6 Průtoková cela
Rozměry v milimetrech

Odběr roztoku

Způsob míchadlový a košíčkový. V předepsaném čase nebo v předepsaných časových intervalech nebo průběžně se odebere předepsané množství roztoku z nádoby ve středu mezi hladinou disoluční tekutiny a horní hranou lopatky míchadla, resp. košíčku, minimálně 10 mm od stěny nádoby.

Způsob průtokový. V případě přístroje s průtokovou celou se vzorky odebírají při výstupu z cely nehledě na uzavřený nebo otevřený okruh.

Je-li předepsán odběr opakovaný, odebraný objem roztoku v případě, kdy je použita metoda s míchadly nebo košíčky, se nahradí vždy stejným objemem disoluční kapaliny, případně se počítá

s jejím úbytkem, s výjimkou automatického vyhodnocování, kdy je disoluční tekutina vracena zpět do nádoby.

Odebraný roztok se zfiltruje přes inertní filtr o vhodné velikosti pórů, který neadsorbuje zkoušený vzorek z disoluční kapaliny a neobsahuje látky, které se extrahují disoluční kapalinou a interferují při použití předepsaného způsobu stanovení. Obsah se stanoví způsobem uvedeným v příslušném článku.

Hodnocení

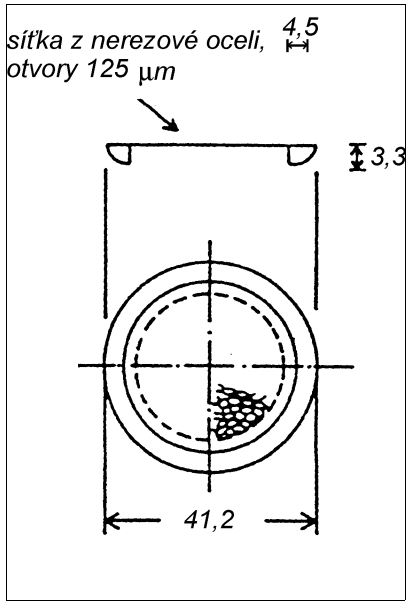
Množství uvolněné účinné látky v předepsaném čase se vyjadřuje v procentech deklarovaného množství.

2.9.4 Zkouška disoluce transdermálních přípravků

Podstata zkoušky. Zkouškou se stanovuje rychlost disoluce léčivých látek z transdermálních náplastí.

1. Disková metoda

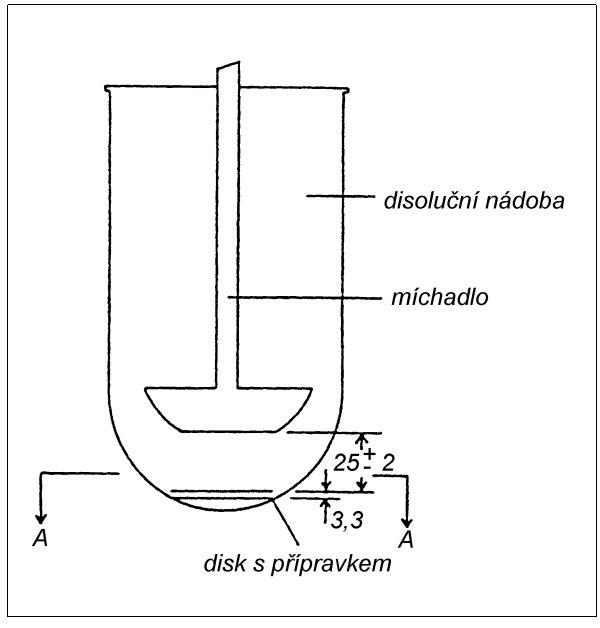
Přístroj. Použije se disoluční přístroj s míchadlem popsaný ve zkoušce disoluce *(2.9.3)* pro pevné perorální lékové formy vybaveným navíc diskem z nerezové oceli ve formě síťky s otvory 125 μm (obr. 2.9.4-1). Disk přidržuje zkoušený přípravek u dna nádoby tak, aby mezi diskem a dnem nádoby byl minimální mrtvý prostor. Disk udržuje náplast rovnou, s povrchem uvolňování orientovaným nahoru a rovnoběžně se spodní hranou listu míchadla. Při zkoušce je mezi listem míchadla a povrchem disku vzdálenost (25 ± 2) mm (obr. 2.9.4-2). Teplota je udržována na (32 ± 0,5) °C. Nádoba je při zkoušce zakryta, aby bylo omezeno vypařování.



Obr. 2.9.4-1 Disk
Rozměry v milimetrech

Postup. Předepsaný objem disoluční kapaliny se umístí do nádoby a vytemperuje na předepsanou teplotu. Transdermální náplast se připevní na disk tak, aby povrch náplasti, z něhož dochází k uvolňování léčivé látky, byl co možno nejvíce rovný. Zkoušený přípravek lze přilepit na disk předepsaným lepidlem nebo proužkem oboustranně lepicí pásky. Lepidlo nebo lepicí páska jsou předem vyzkoušeny z hlediska indiferentnosti k analytické metodě a adsorpci léčivé látky (látek). Náplast se přitiskne na adhezivní stranu disku tak, aby povrchem, u něhož dochází k uvolňování, směřovala nahoru, přičemž náplast nepřesahuje okraje disku. Za předpokladu homogenity přípravku rovnoměrně naneseného na zevní krycí podložku lze pro zkoušku disoluce použít oddělenou část náplasti vhodné a přesně změřené velikosti. Postup s dělením náplasti může být nezbytný k dosažení přiměřených sink podmínek (tj. zamezení procesu sycení roztoku léčivy). Postup však nelze použít u transdermálních přípravků membránového typu. Disk s připevněnou náplastí se umístí na dno nádoby, načež se okamžitě uvede do pohybu míchadlo, např. s rychlostí 100 otáček/min. V určených intervalech se odebírá vzorek roztoku z místa mezi hladinou disolučního média a horní částí listu míchadla ve vzdálenosti větší než 1 cm od stěny nádoby.

Stanoví se obsah v odebraných vzorcích, je-li nutné s korekcí na změnu objemu. Zkouška se opakuje s dalšími náplastmi.



Obr. 2.9.4-2 Umístění míchadla a disku
Rozměry v milimetrech

2. Metoda s extrakční celou

Přístroj

Použije se disoluční přístroj s míchadlem popsaný ve zkoušce disoluce *(2.9.3)* pro pevné perorální lékové formy vybavené navíc extrakční celou.

Extrakční cela je vyrobena z chemicky inertních materiálů. Skládá se z nosiče, víka a v případě potřeby také membrány umístěné na náplasti pro její oddělení od média, které může měnit a nepříznivě ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti náplasti (viz obr. 2.9.4-3).

Nosič. Ve středové části nosiče je kruhová dutina určená k umístění náplasti. Hloubka dutiny je 2,6 mm a její průměr odpovídá rozměru zkoušené náplasti. Používají se průměry 27 mm, 38 mm, 45 mm, 52 mm, což odpovídá objemům dutin 1,48 ml, 2,94 ml, 4,13 ml a 5,52 ml.

Víko. Víko má středový otvor s průměrem voleným podle velikosti zkoušené náplasti. Náplast se proto přesně vycentruje a tím se vymezí povrch uvolňování. Lze použít víka s otvory o průměru 20 mm, 32 mm, 40 mm a 50 mm, což odpovídá plochám 3,14 cm^2, 8,03 cm^2, 12,56 cm^2 a 19,63 cm^2.

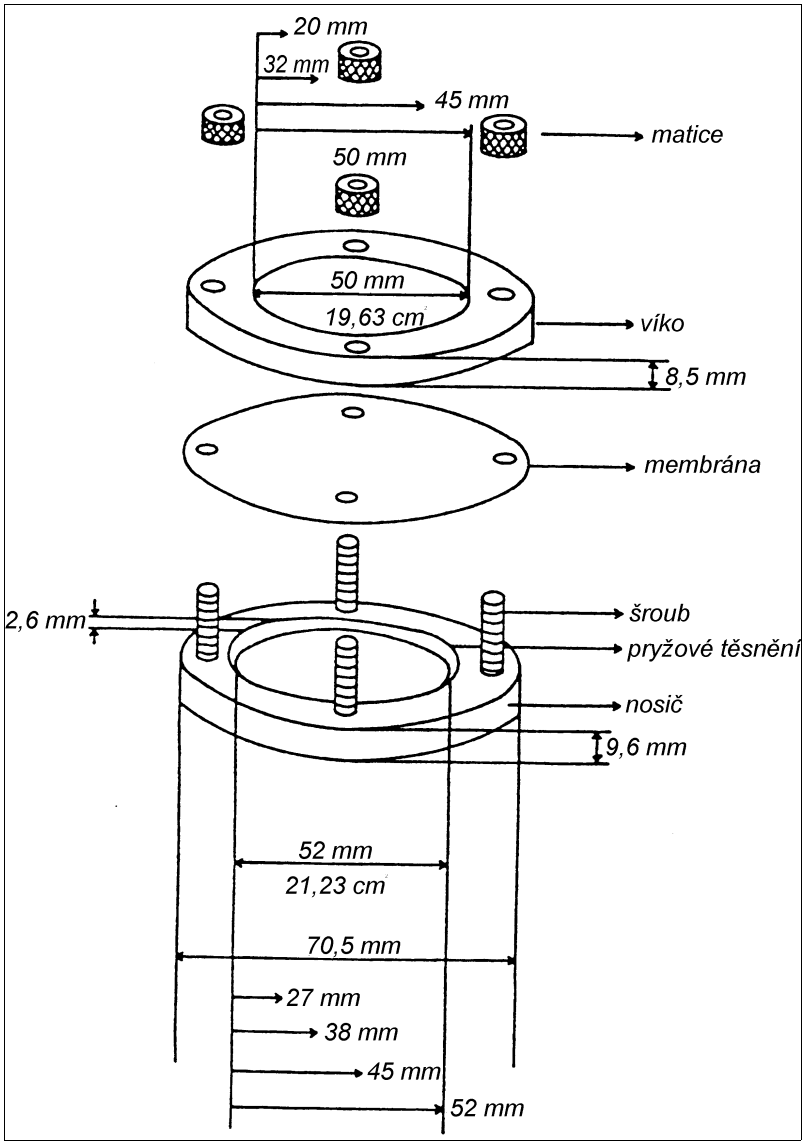
Víko je připevněné k nosiči pomocí šroubů a matic. Těsnění mezi víkem a nosičem tvoří pryžový prstenec umístěný na obvodu dutiny.

Extrakční cela udržuje náplast rovnou s povrchem uvolňování orientovaným nahoru a rovnovnoběžným s dolní hranou listu míchadla. Vzdálenost mezi listem míchadla a povrchem náplasti je (25 ± 2) mm (obr. 2.9.4-4). Teplota je udržována na (32 ± 0,5) °C. Nádoba může být při zkoušce zakryta, aby bylo omezeno vypařování.

Postup

Předepsaný objem disoluční kapaliny se umístí do nádoby a vytemperuje na předepsanou teplotu. Náplast s povrchem uvolňování směřujícím nahoru se umístí přesně do středu dutiny extrakční cely. Pokud je nezbytné, cela se utěsní hydrofobním materiálem (např. vazelínou) naneseným na ploché povrchy a nápast se jím fixuje. Extrakční cela se uzavře a s víkem směřujícím nahoru se vloží na dno nádoby. Ihned se uvede do pohybu míchadlo, např. s počtem otáček 100/min. V určených časovým intervalech se odebírá vzorek roztoku z místa mezi hladinou disolučního média a horní částí listu míchadla ve vzdálenosti větší než 1 cm od stěny nádoby.

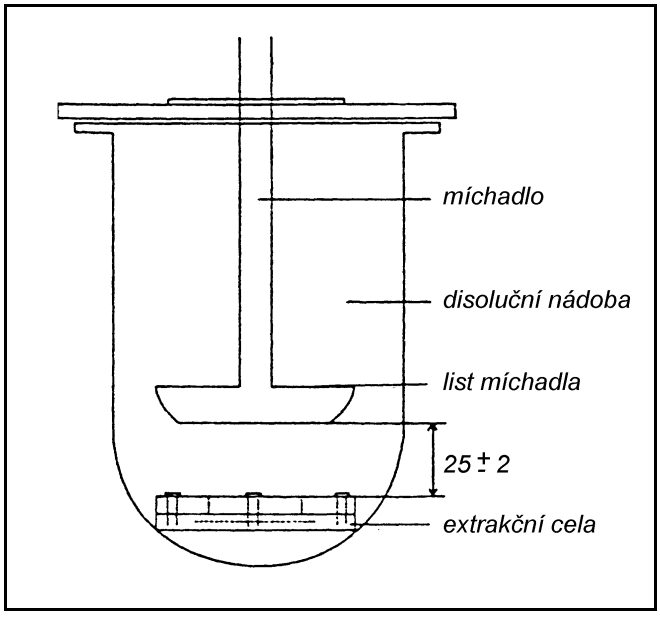
Stanoví se obsah v odebraných vzorcích, je-li nutné s korekcí na změnu objemu. Zkouška se opakuje s dalšími náplastmi.



Obr. 2.9.4-3 Extrakční cela

3. Metoda rotujícího válce

Přístroj. Použije se disoluční přístroj s míchadlem popsaný ve zkoušce pro disoluci *(2.9.3)* pevných perorálních lékových forem. List míchadla a hřídel se nahradí válcem z nerezové oceli (obr. 2.9.4-5). Na začátku každé zkoušky se náplast umístí na válec. Vzdálenost mezi dnem nádoby a válcem činí (25 ± 2) mm. Teplota je udržována na (32 ± 0,5) °C. Pro omezení odpařování je nádoba při zkoušce zakryta.



Obr. 2.9.4-4 Umístění míchadla a extrakční cely
Rozměry v milimetrech

Postup. Předepsaný objem disoluční kapaliny se umístí do nádoby a vytemperuje na předepsanou teplotu. Z náplasti se odstraní ochranná krycí vrstva a náplast se přilepí adhezivní vrstvou na vhodnou porézní inertní membránu, která na všech stranách přesahuje náplast nejméně o 1 cm. Náplast se umístí na čistý povrch válce tak, aby okraje membrány byly ve styku s tímto povrchem.

Lze použít dva způsoby přilepení náplasti na válec:
- na okraje membrány se nanese vhodné lepidlo, je-li třeba, nanese se i na zadní stranu náplasti,
- na vnější stranu válce se přilepí oboustranná lepicí páska.

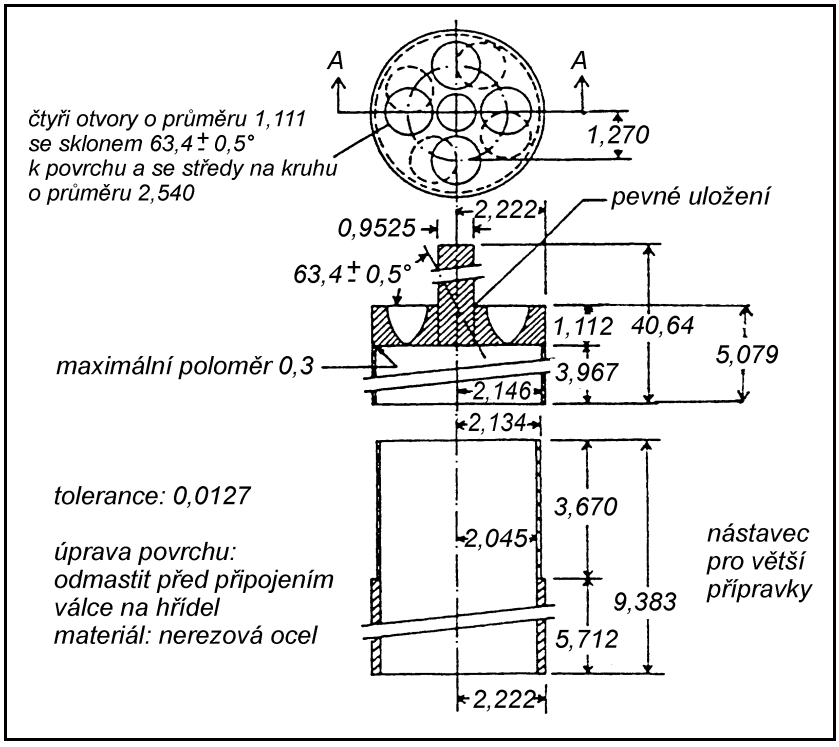
Mírným tlakem se náplast zadní, neadhezivní stranou opatrně přilepí na lepicí pásku tak, aby povrch, u něhož dochází k uvolňování přípravku, byl ve styku s disoluční tekutinou a delší osa náplasti (není-li kruhová) směřovala po obvodu válce.

Lepidlo nebo páska jsou předem vyzkoušeny z hlediska indiferentnosti k analytické metodě a adsorpci léčivé látky (látek).

Válec se připojí k přístroji a ihned se uvede do rotačního pohybu, např. s počtem otáček 100/min. V určených časových intervalech se odebírá vzorek roztoku z místa mezi hladinou disolučního média a horní částí rotujícího válce ve vzdálenosti větší než 1 cm od stěny nádoby.

Stanoví se obsah v odebraných vzorcích podle pokynů v příslušném článku, je-li nutné s korekcí na změnu objemu. Zkouška se opakuje s dalšími náplastmi.

Hodnocení. Přípravek vyhovuje, jestliže množství léčivé látky (látek) uvolněné z náplasti v určeném čase, vyjádřené jako množství na jednotku plochy povrchu náplasti za jednotku času, je v požadovaném rozmezí.



Obr. 2.9.4-5 Rotační válec
Rozměry v centimetrech

2.9.5 Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem

Podstata zkoušky. Při stanovení hmotnostní stejnoměrnosti v předepsaném počtu jednotek pevných jednodávkových lékových forem se zjišťují hmotnosti jednotlivých jednotek zkoušené lékové formy. Vypočítají se odchylky jednotlivých hmotností od nalezené průměrné hmotnosti a určí se, zda jsou tyto odchylky v povolených mezích.

Postup zkoušky. 20 náhodně odebraných jednotek zkoušeného přípravku se jednotlivě zváží a stanoví se jejich průměrná hmotnost. U tobolek a prášků pro parenterální použití se postupuje následovně.

Tobolky

Neporušená tobolka se zváží a otevře se tak, aby nedošlo ke ztrátě částí obalu. Obsah se beze zbytku vyprázdní a obal měkké tobolky se omyje etherem nebo jiným vhodným rozpouštědlem. Po odpaření rozpouštědla se obal zváží. Hmotnost obsahu se vypočítá z rozdílu hmotnosti neporušené tobolky a hmotnosti obalu tobolky.

Prášky pro parenterální použití

Papírový štítek z nádobky jednotky lékové formy se odstraní a povrch nádobky se pečlivě omyje a osuší. Nádobka se otevře a ihned se zváží se všemi oddělenými částmi. Nádobka se

vyprázdní jemným poklepáním, je-li třeba, vypláchne se *vodou R* nebo *lihem 96% R* a suší se při 100 °C až 105 °C po dobu 1 h. Jestliže materiál nádobky nedovoluje zahřátí na tuto teplotu, suší se nádobka při nižší teplotě do konstantní hmotnosti a po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Hmotnost obsahu nádobky se vypočítá z rozdílu hmotnosti nádobky s obsahem a hmotnosti nádobky bez obsahu.

Hodnocení. Z 20 jednotlivě stanovených hmotností jednotek pevné lékové formy se smí nejvýše dvě hmotnosti lišit od povolené odchylky uvedené v tabulce 2.9.5-1. Žádná jednotlivě stanovená hmotnost se nesmí lišit o více než dvojnásobek této odchylky.

Tab. 2.9.5-1

Léková forma	Průměrná hmotnost	Odchylky jednotlivých hmotností v %
tablety neobalené a potahované	80 mg nebo méně	10
	více než 80 mg a méně než 250 mg	7,5
	250 mg nebo více	5
tobolky, zrněné prášky neobalené (jednodávkové) a prášky (jednodávkové)	méně než 300 mg	10
	300 mg nebo více	7,5
prášky pro parenterální použití (jednodávkové)*	více než 40 mg	10
čípky a globule	všechny hmotnosti	5

* Jestliže je průměrná hmotnost přípravku nižší nebo rovna 40 mg, neprovádí se zkouška hmotnostní stejnoměrnosti, provede se zkouška obsahové stejnoměrnosti.

2.9.6 Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem

Podstata zkoušky. Ve zkoušce na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem se jednotlivě stanoví obsah účinné látky v předepsaném počtu jednotek zkoušeného léčivého přípravku. Vypočítají se odchylky jednotlivých obsahů od průměrného obsahu účinné látky a určí se, zda jsou tyto odchylky v povolených mezích.

Zkouška se neprovádí u polyvitaminových přípravků, u přípravků se stopovými prvky nebo v jiných, zdůvodněných a povolených případech.

Postup zkoušky. Za použití vhodné analytické metody se stanoví jednotlivě obsah účinné látky u 10 namátkově vybraných jednotek zkoušeného přípravku a vypočítají se odchylky jednotlivých obsahů od průměrného obsahu účinné látky.

Zkouška A

Tablety, prášky pro parenterální použití, suspenze pro injekce. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže obsah účinné látky v každé jednotlivé jednotce je v rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu. Přípravek nevyhovuje zkoušce, jestliže více než jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo toto rozmezí nebo jestliže jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu účinné látky.

Jestliže jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo rozmezí 85 % až 115 % a žádný není mimo rozmezí 75 % až 125 %, stanoví se jednotlivě obsah účinné látky ve 20 jiných, náhodně vybraných jednotkách. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže jeden jednotlivý obsah účinné látky ze 30 jednotek zkoušeného přípravku je mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu a není mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu účinné látky.

Zkouška B

Tobolky, zrněné prášky, prášky pro jiné než parenterální použití, čípky a globule. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše jeden jednotlivý obsah účinné látky je mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu a žádný není mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu účinné látky. Přípravek nevyhovuje zkoušce, jestliže více než tři jednotlivé obsahy jsou mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu nebo jestliže je jeden nebo více jednotlivých obalů mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu.

Jestliže nejvýše tři jednotlivé obsahy účinné látky jsou mimo rozmezí 85 % až 115 % a žádný není mimo rozmezí 75 % až 125 %, stanoví se jednotlivě obsah účinné látky u náhodně vybraných dalších 20 jednotek zkoušeného přípravku. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše tři jednotlivé obsahy z 30 jednotek zkoušeného přípravku jsou mimo rozmezí 85 % až 115 % průměrného obsahu a žádný jednotlivý obsah účinné látky není mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu účinné látky.

Zkouška C

Transdermální náplasti. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný obsah deseti zkoušených jednotek je v rozmezí 90 % až 110 % deklarovaného obsahu a jednotlivé obsahy všech jednotek jsou v rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu.

2.9.7 Oděr neobalených tablet

Podstata zkoušky. Oděrem se rozumí poškození neobalených tablet mechanickým namáháním za definovaných podmínek, při kterém jsou vystaveny vzájemnému odírání, nárazům a pádům, čímž dochází k narušování jejich povrchu, lámání a štěpení tablet.

Přístroj. Používá se bubínek, viz obr. 2.9.7-1, o vnitřním průměru přibližně 286 mm a hloubce přibližně 39 mm, zhotovený z průhledného plastu s hladkým vnitřním povrchem. Bubínek a jedna jeho strana jsou odnímatelné.

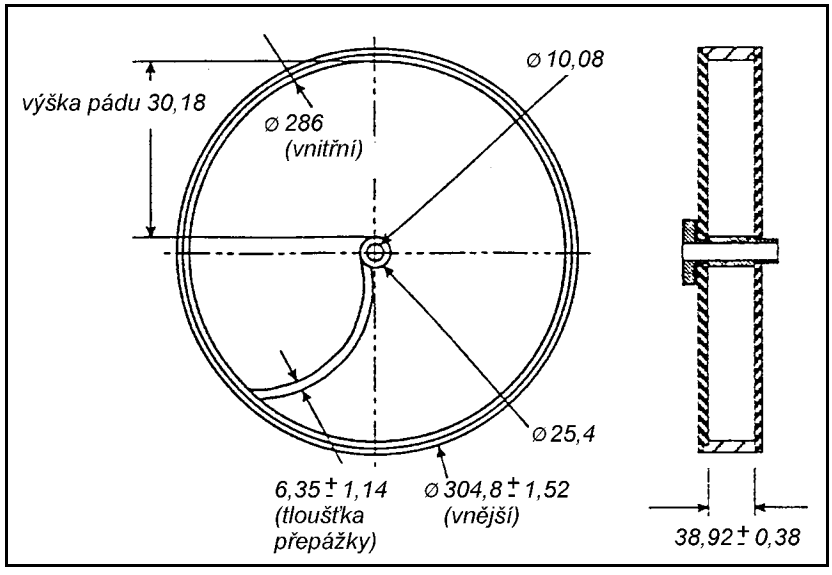
Tablety klouzají a převalují se při každé otáčce bubínku po zakřivené přepážce, která vede ze středu bubínku k jeho vnější obvodové stěně.

Bubínek je ve středu připevněn k vodorovné hřídeli pohonu, který zabezpečuje otáčení bubínku přibližně 25krát za minutu.

Tablety pak při každé otáčce bubínku klouzají, převalují se po přepážce a padají přibližně z výšky 130 mm na obvodovou stěnu bubínku nebo narážejí navzájem na sebe.

Postup zkoušky. Pro tablety do hmotnosti 0,65 g/ks včetně se jako zkoušený vzorek bere 20 tablet, pro tablety o hmotnosti větší než 0,65 g/ks je zkoušený vzorek 10 tablet.

Z tablet se na sítu č. 1000 odstraní volný prach třením jemným kartáčkem nebo profouknutím tlakovým vzduchem. Tablety se potom přesně zváží, umístí do bubínku a spustí se otáčení. Po 100 otáčkách bubínku se tablety vyjmou a odstraní se z nich volný prach stejným způsobem, jak je popsáno výše. Pokud není žádná tableta rozbita, rozlomena nebo její větší část odštípnuta, zváží se tablety s přesností na miligramy.



Obr. 2.9.7-1 Otočný bubínek
Rozměry v milimetrech

U tablet o průměru 13 mm a větším se může vyskytnout problém s reprodukovatelností výsledků díky častému nepravidelnému pohybu tablet. Některé tablety se mohou dotýkat a navzájem se chránit před volným pádem v bubínku. V těchto případech se vyhovujících reprodukovatelných výsledků dosáhne nakloněním bubínku. Obvykle dostatečné je takové nastavení, při kterém osa tvoří úhel 10° se základnou.

Hodnocení. Oděr tablet se vyjadřuje jako procentuální úbytek výchozí hmotnosti tablet. Zaznamená se počet zkoušených tablet.

Obvykle se zkouška provádí jednou. Pokud nejsou výsledky jednoznačné nebo pokud je úbytek hmotnosti tablet větší než 1 %, opakuje se zkouška dvakrát a stanovuje se průměr ze všech tří zkoušek. Úbytek hmotnosti zkoušených tablet nejvýše do 1 % se pro většinu přípravků považuje za vyhovující výsledek.

2.9.8 Pevnost tablet

Podstata zkoušky. Zkouškou se zjišťuje odolnost tablet proti rozdrcení za definovaných podmínek. Měří se síla potřebná k rozdrcení tablety.

Přístroj. Přístroj se skládá ze dvou proti sobě postavených čelistí, z nichž se jedna pohybuje směrem k druhé. Rovné a hladké povrchy čelistí jsou kolmé na směr pohybu. Plocha čelisti musí být větší, než je plocha kontaktu čelistí s tabletou. Přístroj je kalibrován s přesností na 1 newton.

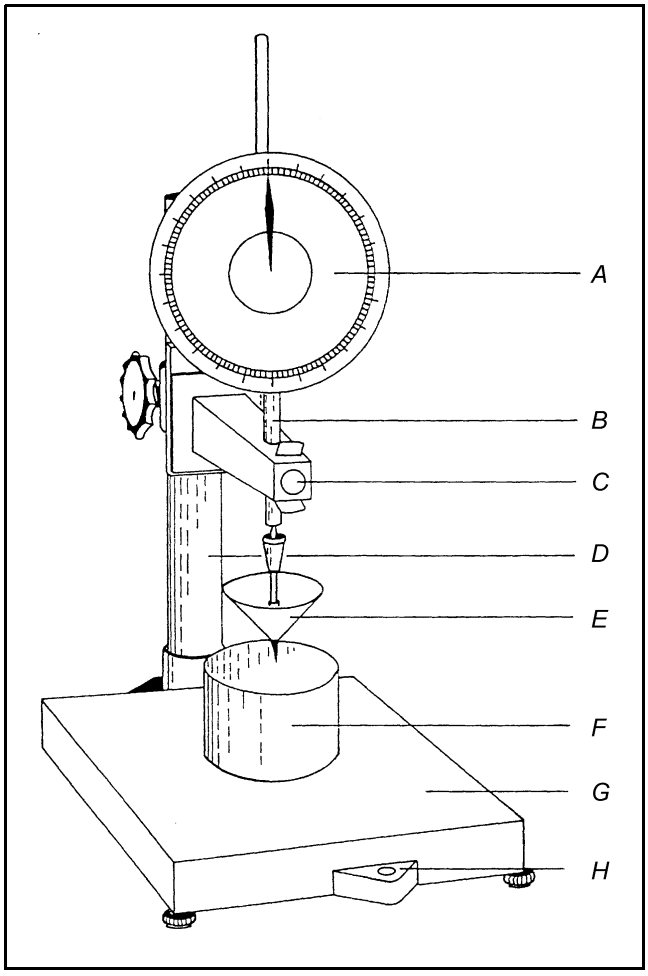
Postup zkoušky. Tableta se umístí mezi čelisti, a to v případě potřeby s ohledem na tvar, půlicí rýhu a značení. Zkouška se provede s 10 tabletami. Při měření jsou jednotlivé tablety orientovány vždy identicky vzhledem k působící síle. Je třeba dbát, aby před každým měřením byly z čelistí i z prostoru mezi nimi odstraněny všechny zbytky rozdrcených tablet.

Uvedený postup se nepoužívá, pokud je použito plně automatické zařízení.

Vyjádření výsledků. Výsledek zkoušky se vyjadřuje v průměrné, minimální a maximální hodnotě naměřené síly vždy v jednotkách newton.

Nutno zaznamenat typ použitého přístroje a v případě, že byly tablety nějakým způsobem mezi čelistmi přístroje orientovány, i způsob orientace tablet.

2.9.9 Měření konzistence penetrometricky



Obr. 2.9.9-1 Penetrometr

Podstata zkoušky. Při zkoušce se měří hloubka průniku (penetrace) předepsaného tělesa do výrobku za stanovených a validovaných podmínek. Měření je prováděno v nádobce určitého tvaru a velikosti.

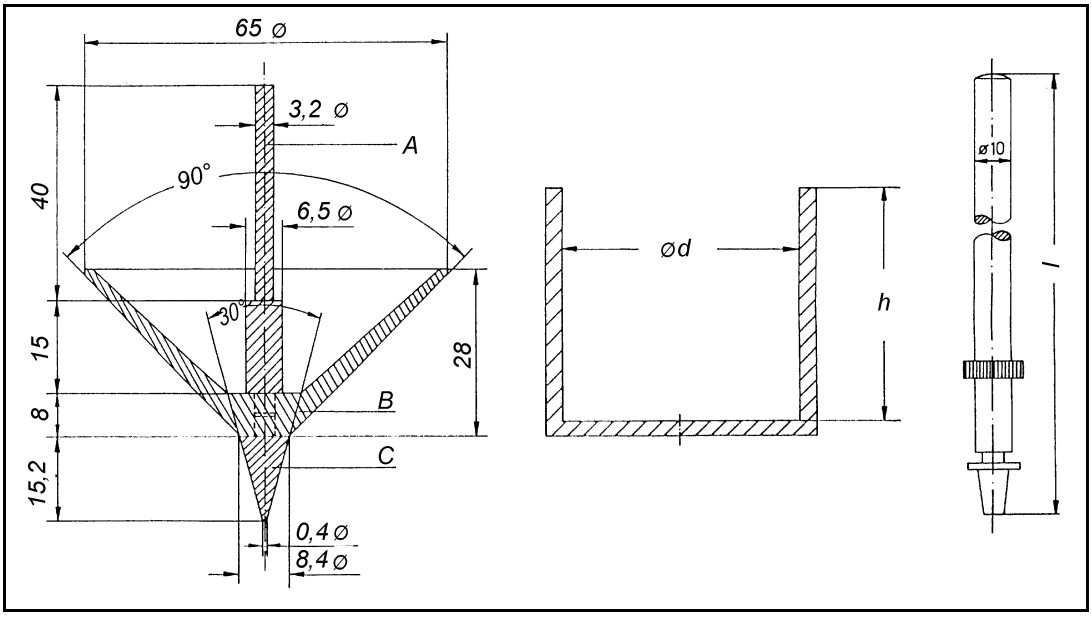
Přístroj. Přístroj se skládá z penetrometru, který je připevněn na stojanu, a penetračního tělesa. Vhodný přístroj je vyobrazen na obr. 2.9.9-1.

Skládá se z:
- vertikálního držáku, který přidržuje a vede penetrační těleso,
- horizontálního stolku,
- zařízení, které zajistí vertikální polohu penetračního tělesa,
- zařízení, kterým lze zkontrolovat horizontální polohu stolku,
- zařízení, které přidržuje a uvolní penetrační těleso,
- stupnice ukazující hloubku průniku, s rozlišením na desetiny milimetru.

Penetrační těleso je vyrobeno z vhodného materiálu, má hladký povrch a je charakterizováno svým tvarem, velikostí a hmotností.

Vhodná penetrační tělesa jsou na obrázcích 2.9.9-2 a 2.9.9-3.

A. stupnice znázorňující hloubku průniku, s přesností na desetiny milimetru,
B. vertikální držák, který přidržuje a vede penetrační těleso,
C. zařízení, které přidržuje a automaticky uvolní penetrační těleso na konstantní dobu,
D. zařízení, které zajistí vertikální polohu penetračního tělesa a horizontální polohu stolku,
E. penetrační těleso (viz obr. 2.9.9-2 a 2.9.9-3,
F. nádobka,
G. horizontální stolek,
H. vodováha pro kontrolu horizontální polohy stolku.



Obr. 2.9.9-2
Rozměry v milimetrech
Mikrokužel (m = 7,0 g), předepsaná nádobka a držák (l = 116 mm; m 16,8 g).

Postup zkoušky. Zkoušené vzorky se připraví jedním z následujících postupů:

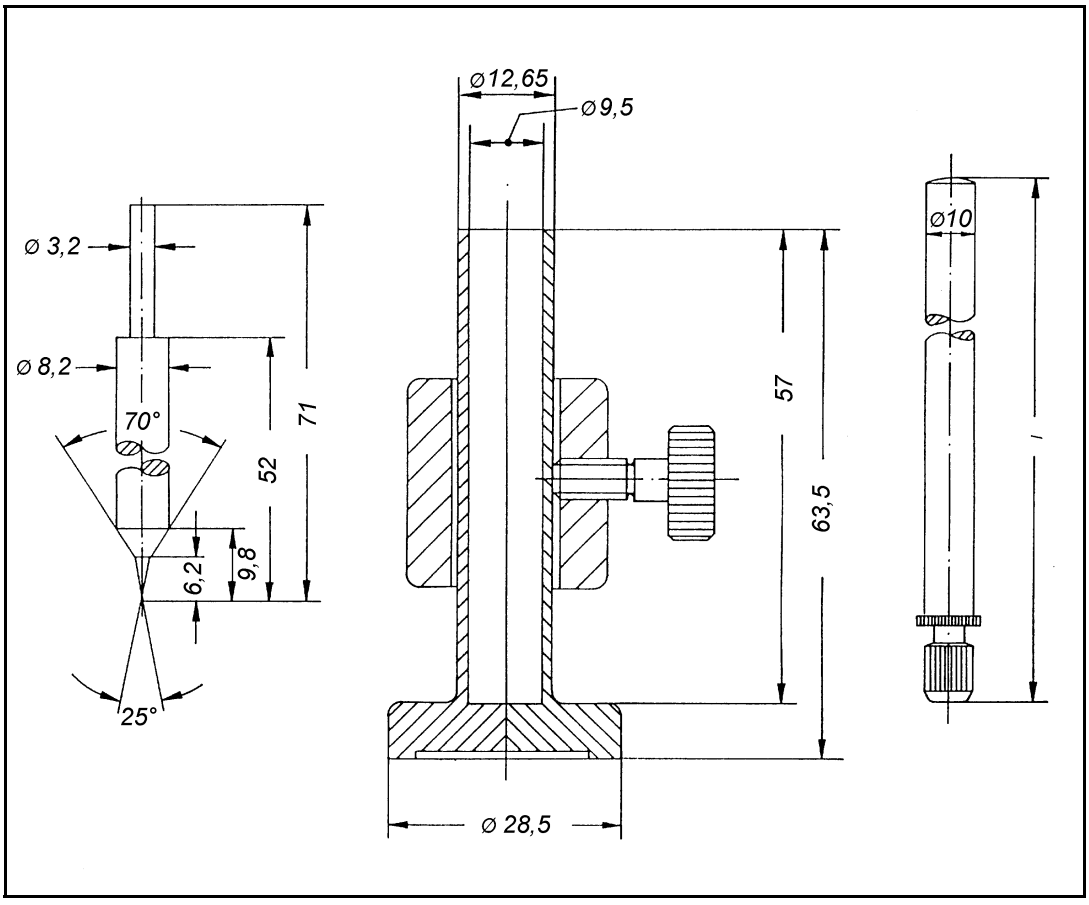
A. Pečlivě se naplní tři nádobky po okraj tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny. Je-li zapotřebí, uhladí se povrch do roviny. Vzorky se uchovávají 24 hod při teplotě (25 ± 0,5) °C, pokud není předepsáno jinak.

B. Tři vzorky se uchovávají 24 hod při teplotě (25 ± 0,5) °C. Poté se míchají vhodným způsobem po dobu 5 min. Pečlivě se naplní tři nádobky po okraj tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny, a je-li zapotřebí, uhladí se povrch do roviny.

C. Roztaví se tři vzorky a pečlivě se naplní do tří nádobek tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny. Vzorky se uchovávají při teplotě (25 ± 0,5) °C po dobu 24 h, pokud není předepsáno jinak.

Stanovení penetrace. Zkoušené vzorky se umístí na stolek penetrometru. Ověří se, zda je povrch vzorku kolmý ke svislé ose penetračního tělesa. Poloha penetračního tělesa vytemperovaného na teplotu (25 ± 0,5) °C se upraví tak, aby se jeho hrot právě dotýkal povrchu vzorku. Penetrační těleso se uvolní přesně na dobu 5 s. Pak se zachytí a odečte se hloubka průniku. Stejným způsobem se změří oba zbývající vzorky.

Hodnocení. Konzistence se vyjadřuje jako průměr tří penetrometrických měření s přesností na desetiny milimetru. Jestliže se některý výsledek odchyluje od průměru o více než ±3 %, je třeba zkoušku opakovat a vyhodnotit výsledky šesti měření jako jejich průměr s relativní směrodatnou odchylkou.



Obr. 2.9.9-3
Rozměry v milimetrech

Kužel (m = 102,5 g), předepsaná nádobka (d = 102 mm nebo 75 mm, h ≥ 62 mm) a držák (l = 162 mm; m = 47,5 g).

2.9.10 Stanovení obsahu ethanolu v tekutých přípravcích a lihová tabulka

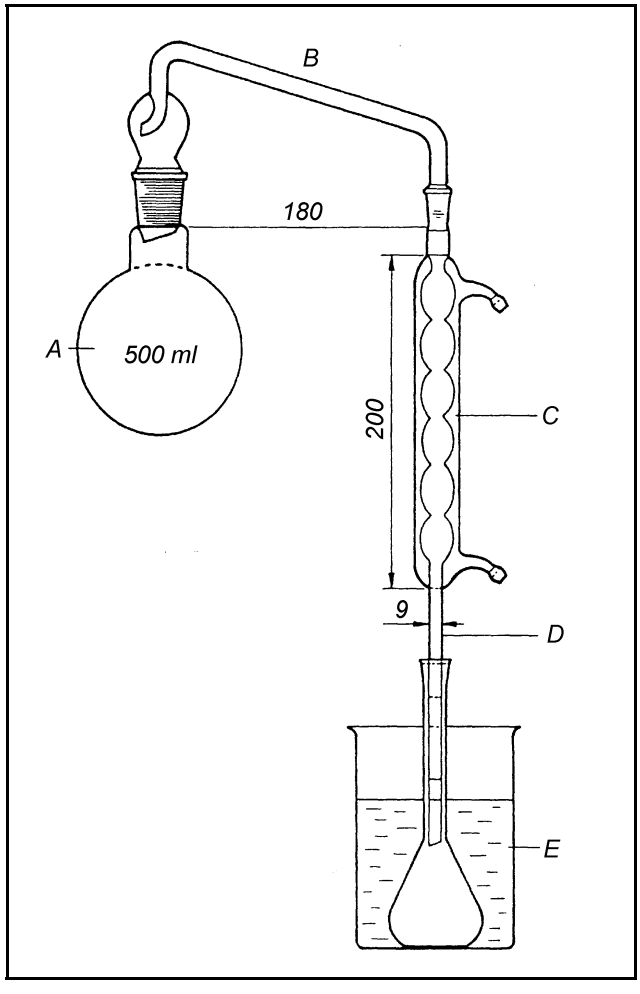
Podstata zkoušky. Ethanol se z tekutého léčivého přípravku obsahujícího ethanol ve směsi látek oddestiluje a ze zjištěné hustoty destilátu se z lihové tabulky odečte obsah ethanolu v destilátu a přepočítá se na obsah ethanolu ve zkoušeném léčivém přípravku.

Pokud by při destilaci přípravku mohly přecházet do destilátu i jiné látky než ethanol a voda, je nutno v příslušném článku upravit postup.

Obsah ethanolu ve zkoušené kapalině se vyjadřuje jako počet objemových dílů ethanolu obsažených ve 100 objemových dílech zkoušené tekutiny, přičemž objemy se měří při (20 ± 0,1) °C. Takto vyjádřený obsah se označuje jako "objemový obsah v procentech" (% *V/V*). Obsah lze také vyjádřit v gramech ethanolu na 100 g zkoušené tekutiny. V tomto případě se jedná o "hmotnostní obsah v procentech" (% *m/m*).

Vztah mezi hustotou při (20 ± 0,1) °C, relativní hustotou (korigovanou na vakuum) a obsahem ethanolu ve směsi voda a ethanol je dán tabulkami vydanými International Organization for Legal Metrology (1972), International Recommendation No. 22.

Přístroj. Přístroj (viz obr. 2.9.10-1) se skládá z baňky s kulatým dnem (A) spojené s destilačním nástavcem (B) s odlučovačem vody z páry a vertikálním chladičem (C). Chladič je opatřen v dolní části trubicí (D), která přivádí destilát do dolní části odměrné baňky o objemu 100 ml nebo 250 ml. Odměrná baňka je ponořena ve směsi vody s ledem (E) po celou dobu destilace. Pod baňkou (A) je umístěn kotouč s kruhovým otvorem o průměru 6 cm; jeho funkcí je omezit nebezpečí pyrolytického rozkladu rozpuštěných látek.



Obr. 2.9.10-1 Přístroj na stanovení obsahu ethanolu
Rozměry v milimetrech

Pyknometrický postup. Do destilační baňky se při (20 ± 0,1) °C odměří 25,0 ml zkoušené kapaliny, zředí se 100 ml až 150 ml *vody destilované R* a přidá se několik kousků pemzy. Na baňku se nasadí destilační nástavec a chladič a destiluje se do získání nejméně 90 ml destilátu ve 100ml odměrné baňce. Baňka s destilátem se vytemperuje na (20 ± 0,1) °C a zředí se při (20 ± 0,1) °C *vodou destilovanou R* na 100,0 ml. Stanoví se relativní hustota roztoku při (20 ± 0,1) °C za použití pyknometru.

Odpovídající hodnoty uvedené v tabulce 2.9.10-1 ve 3. sloupci se vynásobí čtyřmi, tím se získá objemový obsah ethanolu v procentech ve zkoušeném přípravku. Po výpočtu obsahu ethanolu podle tabulky se zaokrouhlí výsledek na jedno desetinné místo.

Hustoměrný postup. Do destilační baňky se při (20 ± 0,1) °C odměří 50,0 ml zkoušeného přípravku, přidá se 200 ml až 300 ml *vody destilované R* a destiluje se výše uvedeným postupem do získání nejméně 180 ml destilátu v odměrné baňce na 250 ml. Baňka s destilátem se vytemperuje na (20 ± 0,1) °C a zředí *vodou destilovanou R* při (20 ± 0,1) °C na 250,0 ml. Destilát se přelije do válce, jehož průměr je alespoň o 6 mm širší než dolní část hustoměru. Pokud objem destilátu nestačí, vezme se dvojnásobný objem zkoušeného přípravku a destilát se zředí *vodou destilovanou R* při (20 ± 0,1) °C na 500,0 ml.

Po odečtu obsahu ethanolu z tabulky 2.9.10-1 se výsledek násobí pěti (korekce na zředění zkoušeného přípravku) a zaokrouhlí se na jedno desetinné místo.

Tab. 2.9.10-1 Vztah mezi hustotou, relativní hustotou a obsahem ethanolu

ϱ_{20} (kg.m^{-3})	Relativní hustota destilátu měřená na vzduchu d_{20}^{20}	Obsah ethanolu % *V/V* při 20 °C
968,0	0,9697	25,09
968,5	0,9702	24,64
969,0	0,9707	24,19
969,5	0,9712	23,74
970,0	0,9717	23,29
970,5	0,9722	22,83
971,0	0,9727	22,37
971,5	0,9733	21,91
972,0	0,9738	21,45
972,5	0,9743	20,98
973,0	0,9748	20,52
973,5	0,9753	20,05
974,0	0,9758	19,59
974,5	0,9763	19,12
975,0	0,9768	18,66
975,5	0,9773	18,19
976,0	0,9778	17,73
976,5	0,9783	17,25
977,0	0,9788	16,80
977,5	0,9793	16,34
978,0	0,9798	15,88
978,5	0,9803	15,43
979,0	0,9808	14,97
979,5	0,9813	14,52
980,0	0,9818	14,07
980,5	0,9823	13,63
981,0	0,9828	13,18
981,5	0,9833	12,74
982,0	0,9838	12,31
982,5	0,9843	11,87
983,0	0,9848	11,44
983,5	0,9853	11,02
984,0	0,9858	10,60
984,5	0,9863	10,18
985,0	0,9868	9,76
985,5	0,9873	9,35
986,0	0,9878	8,94
986,5	0,9883	8,53
987,0	0,9888	8,13
987,5	0,9893	7,73
988,0	0,9898	7,34
988,5	0,9903	6,95
989,0	0,9908	6,56
989,5	0,9913	6,17
990,0	0,9918	5,79
990,5	0,9923	5,42
991,0	0,9928	5,04

Tab. 2.9.10-1 Pokračování

ϱ_{20} (kg.m^{-3})	Relativní hustota destilátu měřená na vzduchu d_{20}^{20}	Obsah ethanolu % *V/V* při 20 °C
991,5	0,9933	4,67
992,0	0,9938	4,30
992,5	0,9943	3,94
993,0	0,9948	3,58
993,5	0,9953	3,22
994,0	0,9958	2,86
994,5	0,9963	2,51
995,0	0,9968	2,16
995,5	0,9973	1,82
996,0	0,9978	1,47
996,5	0,9983	1,13
997,0	0,9988	0,80
997,5	0,9993	0,46
998,0	0,9998	0,13

Stanovení ethanolu v tekutých přípravcích plynovou chromatografií **N**

Podstata zkoušky. Ethanol se stanoví plynovou chromatografií (*2.2.28*) ve zředěných tekutých léčivých přípravcích za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Postup.

Zkoušený roztok (a). Přesně odvážené množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 0,500 g ethanolu se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Zkoušený roztok (b). K přesně odváženému množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu asi 0,5000 g ethanolu se přidá 0,5000 g *1-propanolu R* (vnitřní standard) a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. K 0,5000 g *ethanolu R* se přidá 0,5000 g *1-propanolu R* a zředí se *vodu R* na 50,0 ml.

Roztok vnitřního standardu. 0,5000 g *1-propanolu R* se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,2 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzenem kopolymerem R* (125 μm až 150 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 130 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 180 °C.

Nastřikuje se po 2 μl každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se ověří, že se zde nevyskytuje žádný pík se stejným retenčním časem, jaký má vnitřní standard.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že symetrie píků odpovídajících ethanolu a 1-propanolu je větší než 0,8 a menší než 1,3 a opakovatelnost nástřiků porovnávacího roztoku má relativní směrodatnou odchylku menší než 3.

Metodou vnitřního standardu se provede výpočet obsahu ethanolu. Není-li uvedeno jinak, zkoušený přípravek obsahuje 95 % až 105 % deklarovaného množství ethanolu.

2.9.11 Stanovení methanolu a 2-propanolu v tekutých přípravcích

Podstata zkoušky. Methanol a 2-propanol se stanoví plynovou chromatografií *(2.2.28)* po destilaci zkoušeného tekutého léčivého přípravku.

Postup.

Zkoušený roztok. K určitému množství destilátu *(2.9.10)* se přidají 2,0 ml roztoku vnitřního standardu a upraví se obsah ethanolu na 10,0 % *(V/V)* zředěním *vodou R* na 50,0 ml nebo přidáním *ethanolu R1* (90% *V/V*).

Porovnávací roztok. Připraví se 50,0 ml roztoku obsahujícího 2,0 ml roztoku vnitřního standardu, 10,0 % *(V/V) ethanolu R1*, 0,05 % *(V/V) 2-propanolu R* a dostatečně *methanolu bezvodého R*, aby vzniklý roztok obsahoval 0,05 % *(V/V)* methanolu; při výpočtu se bere v úvahu obsah methanolu v použitém *ethanolu R1*.

Roztok vnitřního standardu. Připraví se roztok obsahující 2,5 % *(V/V) 1-propanolu R.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 150 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 130 °C, teplota nástřikového prostoru na 200 °C a teplota detektoru na 220 °C.

Nastřikuje se po 1 μl každého roztoku.

Vypočítá se obsah methanolu a 2-propanolu ve zkoušeném léčivém přípravku.

Při použití této metody může být detegováno i méně než 0,025 % *(V/V)* methanolu a 2-propanolu.

Stanovení methanolu a 2-propanolu v tekutých přípravcích plynovou chromatografií **N**

Podstata zkoušky. Methanol a 2-propanol se stanoví plynovou chromatografií (*2.2.28*) head-space nástřikem plynné fáze nad zkoušeným přípravkem.

Postup

Zkoušený roztok (a). 2,5 ml zkoušeného přípravku se smíchá s 2,5 ml *vody R.*

Porovnávací roztok (a). Připraví se 50,0 ml roztoku obsahujícího 0,05 % (*V/V*) *methanolu R* (počítá se i s methanolem obsaženým v použitém *ethanolu R1*), 0,05 % (*V/V*) *2-propanolu R* a 0,005 % (*V/V*) *mravenčanu ethylnatého R.*

Porovnávací roztok (b). 2,50 ml zkoušeného přípravku se smíchá s 2,50 ml porovnávacího roztoku (a).

Porovnávací roztok (c). K 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 2,5 ml *ethanolu R1* zředěného přibližně na stejnou koncentraci, jako je ve zkoušeném přípravku.

Do lahviček pro opakovaný odběr vhodného objemu (10 ml až 25 ml) se vzduchotěsně uzavře zvolený objem zkoušeného roztoku (a), porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) a lahvičky se zahřívají 20 min při teplotě 40 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2,5 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *ethyvinylbenzen-divinylbenzenem kopolymerem R* (125 μm až 150 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 40 ml/mim,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 140 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 180 °C.

Nastřikuje se po 0,50 ml plynné fáze nad jednotlivými roztoky. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je rozlišení mezi píkem 2-propanolu a mravenčanu ethylnatého nejméně 1,3 a poměr signálu píků odpovídajících methanolu a 2-propanolu k šumu je nejméně 3.

Hodnocení. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) výška píku odpovídajícího methanolu a výška píku odpovídajícího 2-propanolu nepřevyšují jednotlivě polovinu plochy odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (nejvýše 0,05 % (*V/V*) methanolu a nejvýše 0,05 % (*V/V*) 2-propanolu).

2.9.12 Klasifikace velikosti částic prášků sítováním

Podstata zkoušky. Stupeň jemnosti prášku lze vyjádřit vztažně k sítům vyhovujícím požadavkům na neanalytická síta *(2.1.4)*.

Postup zkoušky. Sestaví se síta a postupuje se vhodným způsobem do prakticky úplného rozdělení zkoušeného vzorku podle velikosti částic. Oddělené frakce prášku se zváží.

Vyjádření výsledku. Stupeň jemnosti prášku určený sítováním se vyjadřuje odborným názvem, který má vztah k číselnému označení síta. Pokud není možno stupeň jemnosti prášku označit odborným názvem, vyjadřuje se jako podíl prášku v procentech *(m/m)* procházející použitým sítem (síty).

K označení prášků se používají následující odborné názvy:

Hrubý prášek. Nejméně 95 % prochází sítem číslo 1400 a nejvýše 40 % prochází sítem číslo 355.

Středně jemný prášek. Nejméně 95 % prochází sítem č. 355 a nejvýše 40 % prochází sítem č. 180.

Jemný prášek. Nejméně 95 % prochází sítem č. 180 a nejvýše 40 % prochází sítem č. 125.

Velmi jemný prášek. Nejméně 95 % prochází sítem č. 125 a nejvýše 40 % prochází sítem č. 90.

Pokud je uvedeno jedno číslo síta, prochází sítem s tímto číslem nejméně 97 % prášku, není-li předepsáno jinak.

2.9.13 Mikroskopické stanovení limitní velikosti částic

Podstata zkoušky. Za pomoci vhodného mikroskopu se stanoví počet částic větších, než je předepsaný limit.

Postup. Naváží se vhodné množství zkoušeného prášku (např. 10 mg až 100 mg) a disperguje se v 10 ml vhodné kapaliny, ve které se prášek nerozpouští. V případě potřeby se přidá vhodné smáčedlo. Část homogenní suspenze se přenese do vhodné odečítací komůrky a pod mikroskopem se prohlédne plocha odpovídající 10 μg zkoušeného prášku. Počítají se všechny částice, jejichž největší rozměr je větší než předepsaný limit velikosti částic. Velikostní limit a přípustný počet částic přesahující tento limit jsou uvedeny v příslušném článku.

2.9.14 Stanovení měrné plochy povrchu pomocí průniku vzduchu

Podstata zkoušky

Měrný povrch částic suchých prášků v oblasti pod velikostmi lékopisných sít vyjádřený v m^2/g se stanoví pomocí doby permeace předepsaného objemu vzduchu přes standardní výlisek o známých parametrech ze zkoušeného materiálu. Ke zkoušce se použije suchý, prosátý prášek. Ve vztahu pro výpočet měrného povrchu se nebere v úvahu vliv molekulárního toku, který se může projevit při hodnocení prášků s částicemi menšími než několik mikrometrů.

Přístroj

Přístroj ke stanovení má dvě části, permeační celu a manometr.

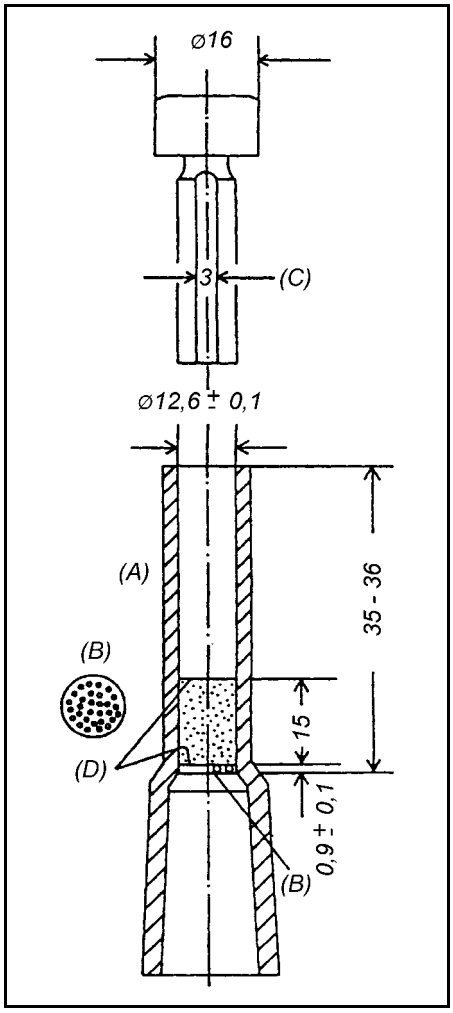
Permeační cela (obr. 2.9.14-1) je skleněný nebo kovový válec z nekorodujícího materiálu o vnitřním průměru (12,6 ± 0,1) mm (A). Spodní konec cely je vzduchotěsně spojen s manometrem, např. pomocí vhodného nástavce (obr. 2.9.14-2). Ve vzdálenosti (50 ± 15) cm od horního konce cely je 0,5 mm až 1 mm silná objímka, buď součást cely nebo samostatná, ale vzduchotěsně připojená. Podpírá kovový kotouč z nekorodujícího materiálu (B) o síle (0,9 ± 0,1) mm, perforovaný třiceti až čtyřiceti otvory o průměru 1 mm pravidelně rozloženými po ploše kotouče.

Do cely lze zasunout kovový píst z nekorodujícího materiálu (C) tak, že vůle mezi pístem a celou není větší než 0,1 mm. Plocha dolní části pístu s ostrými okraji svírá s hlavní osou cely pravý úhel. Na jedné straně pístu je 3 mm dlouhý a 0,3 mm hluboký zářez umožňující únik vzduchu. Horní část pístu je rozšířena, takže když je píst zcela zasunut do cely, dosedá rozšíření na její horní okraj a vzdálenost mezi spodní plochou pístu a perforovaným kotoučem (B) je (15 ± 1) mm.

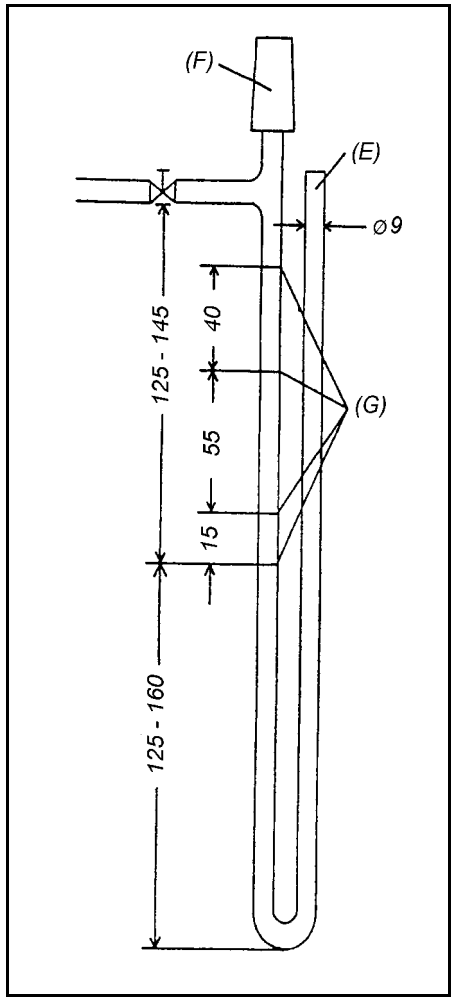
Průměr kroužků z filtračního papíru (D) s rovnými okraji se shoduje s průměrem cely.

Skleněný manometr ve tvaru U-trubice (E) (obr. 2.9.14-2) se standardními stěnami má jmenovitý vnější průměr trubice 9 mm, vnitřní 7 mm. Na horní konec jednoho ramene manometru lze připojit permeační celu (F). Na rameni manometru připojeném k permeační cele je 125 mm až 145 mm od postranní trubice vyleptaný kroužek. Ve vzdálenostech 15 mm, 70 mm a 110 mm od této značky směrem k hornímu konci trubice jsou vyleptané další kroužky (G). Rameno manometru připojené k permeační cele se evakuuje pomocí postranní trubice umístěné 250 mm až 305 mm od spodní části manometru. Postranní trubici lze uzavřít kohoutkem, jehož vzdálenost od manometrické trubice nepřesahuje 50 mm.

Manometr je upevněn ve vertikální poloze a až ke spodní značce je naplněn *dibutylftalatem R* obsahujícím lipofilní barvivo.



Obr. 2.9.14-1 Permeační cela
Rozměry v milimetrech



Obr. 2.9.14-2 Manometr
Rozměry v milimetrech

Postup zkoušky

Je-li předepsáno, zkoušený prášek se vysuší a pak se proseje přes vhodné síto (např. č. 125), aby se rozrušily shluky částic. Hmotnost zkoušeného prášku M se vypočte dle vztahu:

$$M = V \cdot \rho \cdot (1 - \varepsilon) \,, \qquad (1)$$

v němž značí:

V - objem výlisku prášku,

ρ - hustotu zkoušené látky v g/ml,

ε - porozitu výlisku prášku.

Do vzorce (1) se nejprve dosadí předpokládaná hodnota porozity 0,5 a vypočte se hmotnost zkoušeného prášku.

Na perforovaný kovový kotouč (B) permeační cely se položí kroužek filtračního papíru a zkoušený prášek o vypočtené hmotnosti se naváží s přesností na 1 mg. Pak se prášek pečlivě přenese do vyčištěné odvážené permeační cely a opatrně se setřepe tak, aby jeho hladina byla vodorovná. Povrch prášku se pak pokryje dalším kroužkem filtračního papíru. Prášek se potom pomalu stlačuje pístem tak, aby nedošlo k rotačnímu pohybu, až je píst úplně zasunut do permeační cely. Nepodaří-li se píst zcela zasunout, sníží se množství použitého prášku. Jestliže naopak stlačovaný prášek neklade dostatečný odpor, množství prášku se zvýší. V takovém případě se znovu vypočte porozita, viz vzorec (1). Píst se odstraní nejdříve po 10 s.

Permeační cela se vzduchotěsně připojí k trubici manometru a pomocí gumového balonku se z manometru odstraňuje vzduch, dokud hladina zbarvené tekutiny nedosáhne nejvyšší značky. Pak se kohoutek uzavře a horní část cely se utěsní, například gumovou zátkou, a ověří se, zda je zařízení vzduchotěsné. Zátka se potom odstraní a stopkami se změří doba potřebná k tomu, aby tekutina poklesla od druhé ke třetí značce.

Po změření doby průtoku se měrný povrch (S), vyjádřený v m^2/g, vypočte podle vzorce:

$$S = \frac{K \cdot \sqrt{\varepsilon^3 \cdot \sqrt{t}}}{\rho \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \sqrt{\eta}} , \qquad (2)$$

v němž značí:

t - dobu průtoku v sekundách,

η - dynamickou viskozitu vzduchu v milipascalsekundách (mPa.s), viz tab. 2.9.14-1,

K - přístrojovou konstantu stanovenou podle vzorce (4),

ρ - hustotu zkoušené látky v g/ml,

ε - porozitu výlisku prášku.

Kalibrace přístroje

Objem výlisku prášku se stanoví metodou náhrady rtutí:

Do permeační cely se vloží dva kroužky filtračního papíru a jejich okraje se stlačí tyčinkou o průměru málo menším, než je průměr cely tak, aby kroužky dosedly celou plochou na perforovaný kovový kotouč. Pak se cela naplní rtutí, ze stěny cely se odstraní vzduchové bublinky a přebytek rtuti se odstraní, aby povrch rtuti na konci cely byl rovný. Jestliže je cela z materiálu, který tvoří se rtutí amalgam, potře se cela i kovový kotouč nejdříve tenkou vrstvou tekutého parafinu. Potom se rtuť vylije do odvážené kádinky a stanoví se její hmotnost (M_A) a teplota.

Připraví se výlisek z referenčního prášku a cela se doplní rtutí tak, aby na konci cely vznikl rovný povrch. Rtuť se pak vylije do odvážené kádinky a stanoví se její hmotnost (M_B).

Objem výlisku prášku se vypočte podle vzorce:

$$V = \frac{M_A - M_B}{\rho_{Hg}} , \qquad (3)$$

v němž značí:

M_A - M_B - rozdíl mezi hmotnostmi rtuti v g,

ρ_{Hg} - hustotu rtuti při teplotě stanovení v g/ml.

Celý pokus se opakuje dvakrát, vždy s novou dávkou prášku, přičemž se vypočtené objemy nesmí od sebe lišit více než o 0,01 ml. Pro další výpočty se použije průměr ze třech popsaným způsobem provedených stanovení.

Přístrojová konstanta K se stanoví pomocí referenčního prášku o známém měrném povrchu a o známé hustotě následovně:

Potřebné množství referenčního prášku k pokusu (vzorec 1) se vypočte pomocí zjištěné hustoty a stanoveného objemu výlisku (vzorec 3).

Prášek se zhomogenizuje a rozvolní dvouminutovým třepáním v prachovnici na 100 ml. Pak se připraví výlisek prášku a změří se doba průtoku vzduchu, jak již bylo popsáno dříve. Přístrojová konstanta (K) se vypočte podle vzorce:

$$K = \frac{S_{sp} \cdot \rho \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \sqrt{\eta}}{\sqrt{\varepsilon^3} \cdot \sqrt{t}}, \qquad (4)$$

v němž značí:

S_{sp} - zjištěný měrný povrch referenčního prášku,

ρ - hustotu zkoušené látky v g/ml,

ε - porozitu výlisku prášku,

t - dobu průtoku v sekundách,

η - dynamickou viskozita v milipascalsekundách, viz tab. 2.9.14-1.

Hustotu rtuti a viskozitu vzduchu za různé teploty uvádí následující tabulka.

Tab. 2.9.14-1

Teplota (°C)	Hustota rtuti (g/ml)	Viskozita vzduchu η (mPa.s)	$\sqrt{\eta}$
16	13,56	0,01800	0,1342
17	13,56	0,01805	0,1344
18	13,55	0,01810	0,1345
19	13,55	0,01815	0,1347
20	13,55	0,01819	0,1349
21	13,54	0,01824	0,1351
22	13,54	0,01829	0,1353
23	13,54	0,01834	0,1354
24	13,54	0,01839	0,1356

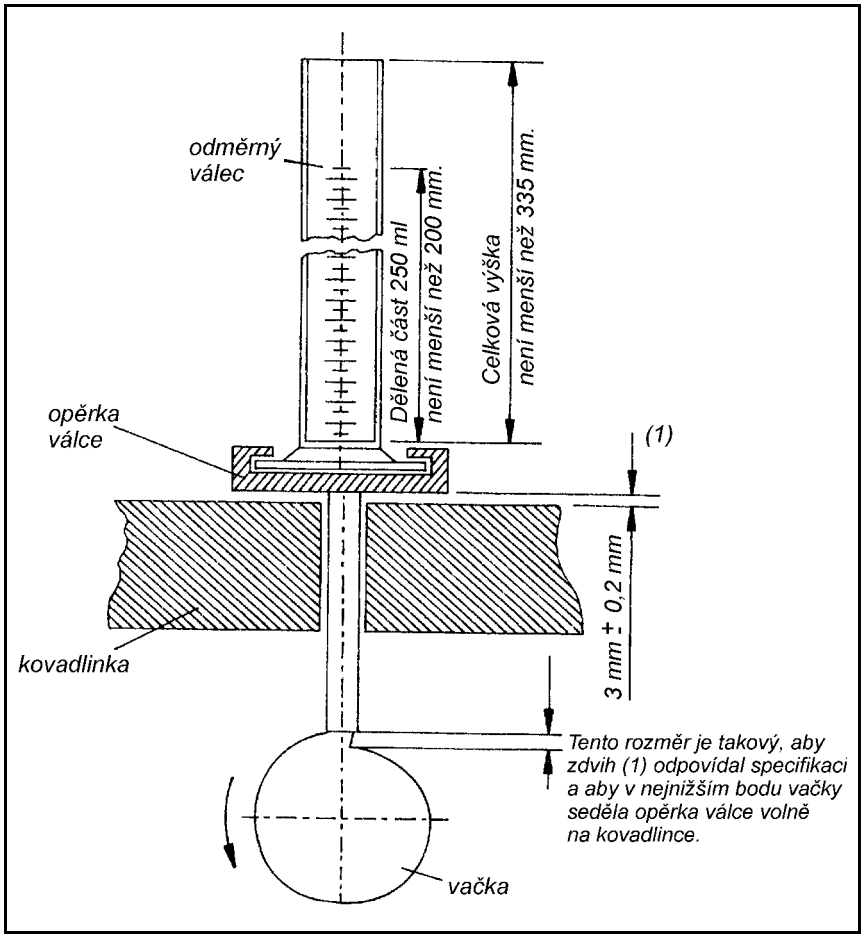
2.9.15 Zdánlivý objem

Podstata zkoušky. Zkouškou se stanoví za definovaných podmínek zdánlivé objemy před a po setřesení, míra setřesení a zdánlivé hustoty rozdrobněných nebo jiným způsobem upravených pevných látek (např. prášků, granulí).

Přístroj, viz obr. 2.9.15-1, se skládá:

- ze zařízení schopného uskutečnit za 1 min (250 ± 15) klepnutí z výšky (3 ± 0,2) mm. Opěrka a držák odměrného válce mají hmotnost (450 ± 5) g,
- z odměrného válce na 250 ml kalibrovaného po 2 ml o hmotnosti (220 ± 40) g.

Postup. Do suchého odměrného válce se nasype bez stlačení 100,0 g (mg) zkoušené látky. Není-li to možné, zvolí se zkoušený vzorek o zdánlivém objemu od 50 ml do 250 ml a jeho hmotnost se uvede při vyjádření výsledků. Odměrný válec se upevní do držáku a odečte se zdánlivý objem V_0 zaokrouhlený na celý mililitr. Provede se 10, 500 a 1250 sklepnutí a odečtou se odpovídající zdánlivé objemy V_{10}, V_{500} a V_{1250} zaokrouhlené na celý mililitr. Je-li rozdíl mezi V_{500} a V_{1250} větší než 2 ml, provede se dalších 1250 sklepnutí.



Obr. 2.9.15-1

Vyjádření výsledků

a) *Zdánlivé objemy*
- zdánlivý objem před setřesením (sypný objem): V_0 ml,
- zdánlivý objem po setřesení (setřesný objem): V_{1250} ml nebo V_{2500} ml.

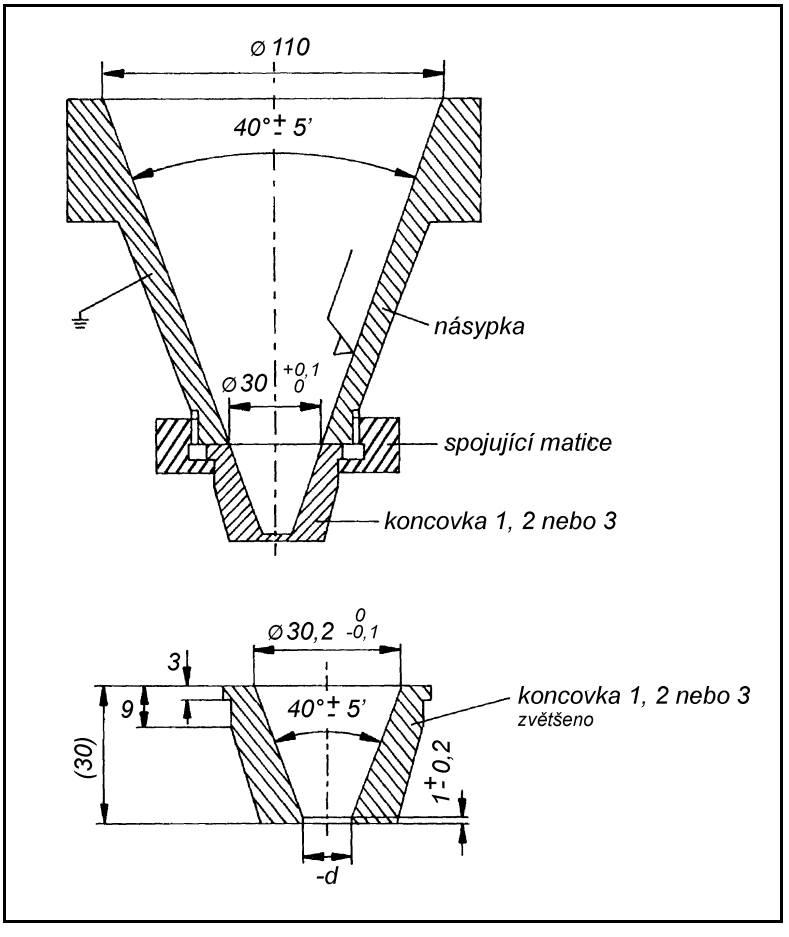
b) *Míra setřesení*: rozdíl V_{10} ml - V_{500} ml.

c) *Zdánlivé hustoty*
- zdánlivá hustota před setřesením (sypná hustota): m/V_0 (g/ml),
- zdánlivá hustota po setřesení (setřesná hustota): m/V_{1250} nebo m/V_{2500} (g/ml).

2.9.16 Sypnost

Podstata zkoušky. Zkouškou se sleduje vlastnost rozdrobněných nebo jiným způsobem upravených tuhých látek (např. prášků a zrněných prášků) vertikálně téci (sypat)za předepsaných podmínek.

Přístroj. Podle sypných vlastností zkoušeného materiálu se použije násypka s vhodným úhlem a průměrem hrdla, bez stonku nebo se stonkem. Násypka je udržována pomocí vhodného zařízení ve svislé poloze a celá sestava musí být chráněna před otřesy. Typické násypky jsou na obr. 2.9.16-1 a 2.9.16-2.



Obr. 2.9.16-1 Násypka s výměnnou dolní částí (koncovka)
Koncovka vyrobena z nerezavějící kyselinovzdorné oceli (V4A, CrNi).
Rozměry v milimetrech

Tab. 2.9.16-1

Koncovka	Průměr (*d*) dolního otvoru v mm
1	10 ± 0,01
2	15 ± 0,01
3	25 ± 0,01

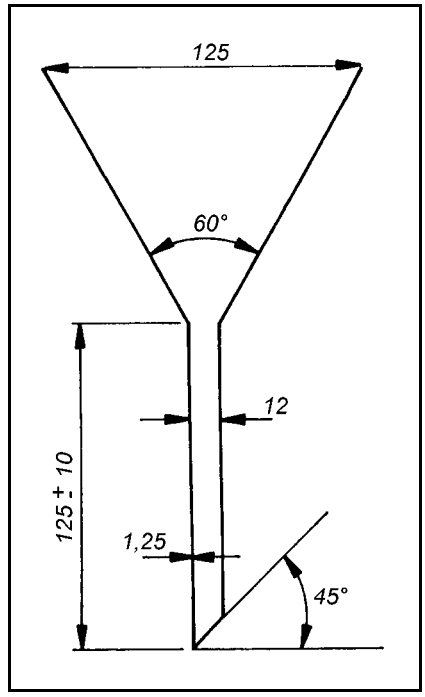
Postup. Do suché násypky, jejíž dolní otvor je vhodným způsobem uzavřen, se nasype bez stlačování zkoušený vzorek zvážený s přesností 0,5 %. Množství vzorku závisí na zdánlivém objemu a použitém přístroji. Dolní otvor násypky se otevře a měří se doba sypání celého množství vzorku. Provedou se tři stanovení.

Vyjádření výsledků. Sypnost se vyjadřuje jako doba sypání 100 g vzorku v sekundách a desetinách sekundy.

Výsledky závisejí na podmínkách uchovávání zkoušeného materiálu.

Výsledky se mohou vyjádřit jako:

a) aritmetický průměr měření, jestliže se žádná naměřená hodnota neodchyluje od průměrné hodnoty o více než ±10 %,
b) rozmezí hodnot, jestliže se jednotlivé hodnoty liší od průměrné hodnoty o více než ±10 %,
c) graf závislosti hmotnosti na době sypání,
d) nekonečný čas, jestliže se nevysype celý vzorek.



Obr. 2.9.16-2
Rozměry v milimetrech

2.9.17 Zkouška na využitelný objem

Podstata zkoušky. Zkouškou se sleduje u injekčních a infuzních přípravků využitelný objem tekutin pro parenterální podání v jednotlivých nádobách.

Injekční přípravky

Jednodávkové injekční přípravky se dodávají v obalech pro jedno použití, náplních nebo v předem naplněných injekčních stříkačkách.

Obaly pro jedno použití

Objem injekční tekutiny injekčního přípravku v obalu pro jedno použití musí být dostatečný pro odebrání jmenovité dávky. Nadbytek této tekutiny nesmí být takový, aby představoval riziko v případě, že by byl podán celý obsah balení.

Dodržení požadavku na využitelný objem se zajišťuje tím, že objem injekční tekutiny jednodávkových obalů je větší než jmenovitý objem, a to v míře určené vlastnostmi léčivého přípravku.

Suspenzní a emulzní injekční přípravky se musí před odebráním injekční tekutiny a před stanovením hustoty důkladně protřepat.

Olejovité a viskózní injekční přípravky, je-li to potřebné, je možno bezprostředně před odebráním injekční tekutiny zahřát a důkladně protřepat. Před vlastním stanovením objemu se injekční tekutina ochladí.

Obaly s jmenovitým objemem menším než 5 ml

Postup zkoušky. Ke zkoušce se použije šest jednotek injekčního přípravku. Pět se použije pro vlastní měření a jedna se použije k propláchnutí použité injekční stříkačky a jehly.

Injekční stříkačka se zvolí taková, aby její objem nebyl větší než dvojnásobek měřeného objemu a nasadí se příslušná jehla. Z jednotky určené k propláchnutí se do injekční stříkačky nasaje malé množství zkoušené injekční tekutiny a ta se vytlačí z injekční stříkačky držené vertikálně jehlou směřující vzhůru, aby se odstranil všechen vzduch.

Z jedné z pěti jednotek, určených pro vlastní měření, se odebere injekční stříkačkou co možná nejvíce injekční tekutiny, vytlačí se všechen vzduch a tekutina se přenese do předem vysušené a odvážené vhodné váženky, aniž by se vyprázdnila injekční jehla. Váženka se zkoušenou injekční tekutinou se zváží a stanoví se hmotnost této tekutiny. Postup se opakuje s dalšími čtyřmi jednotkami zkoušeného přípravku.

Stanoví se hustota injekční tekutiny při teplotě, při níž se provádí vlastní zkouška. Využitelný objem zkoušeného injekčního přípravku se vypočítá z podílu hmotností injekční tekutiny jednotlivých obalů a hustoty.

Hodnocení. Injekční přípravek vyhovuje zkoušce na využitelný objem, jestliže objem stanovený jednotlivě v pěti jednotkách není menší než jmenovitý objem.

Obaly s jmenovitým objemem 5 ml a více

Postup zkoušky. Ke zkoušce se použije šest jednotek injekčního přípravku. Pět se použije pro vlastní měření a jedna se použije k propláchnutí použité injekční stříkačky a jehly.

Injekční stříkačka se zvolí taková, aby její objem nebyl větší než dvojnásobek měřeného objemu a nasadí se příslušná jehla. Z jednotky určené k propláchnutí se do injekční stříkačky nasaje malé množství zkoušené injekční tekutiny a ta se vytlačí z injekční stříkačky držené vertikálně jehlou směřující vzhůru, aby se odstranil všechen vzduch.

Z jedné z pěti jednotek, určených pro vlastní měření, se odebere injekční stříkačkou co možná nejvíce injekční tekutiny, vytlačí se všechen vzduch a roztok se přenese do suchého odměrného válce, jehož objem je takový, že měřený objem injekční tekutiny zaplňuje nejméně 40 % jmenovitého objemu válce. Změří se objem zkoušené injekční tekutiny. Postup se opakuje s dalšími čtyřmi jednotkami zkoušeného injekčního přípravku.

Hodnocení. Injekční přípravek vyhovuje zkoušce na využitelný objem, jestliže objem stanovený jednotlivě v pěti jednotkách není menší než jmenovitý objem.

Náplně a předem naplněné injekční stříkačky

Objem injekční tekutiny obsažené v náplni nebo předem naplněné injekční stříkačce má být takový, aby umožnil odebrání jmenovité dávky.

Suspenzní a emulzní injekční přípravky se musí před odebráním injekční tekutiny a před stanovením hustoty důkladně protřepat.

Olejovité a viskózní injekční přípravky, je-li to potřebné, je možno bezprostředně před odebráním injekční tekutiny zahřát a důkladně protřepat. Před vlastním stanovením objemu se injekční tekutina ochladí.

Postup zkoušky. Ke zkoušce se použije pět jednotek injekčního přípravku. V případě potřeby se první zkoušená jednotka opatří příslušenstvím potřebným pro její použití (jehla, válec, injekční stříkačka) a pomalým stlačováním pístu se přenese celý objem injekční tekutiny bez vyprázdnění injekční jehly do předem vysušené a zvážené váženky. Váženka se zkoušenou injekční tekutinou se zváží a stanoví se hmotnost této tekutiny. Postup se opakuje s dalšími čtyřmi jednotkami.

Stanoví se hustota injekční tekutiny při teplotě, při níž se provádí vlastní zkouška. Využitelný objem zkoušeného injekčního přípravku se vypočítá z podílu hmotností injekční tekutiny jednotlivých obalů a hustoty.

Hodnocení. Injekční přípravek vyhovuje zkoušce na využitelný objem, jestliže objem stanovený jednotlivě v pěti jednotkách není menší než jmenovitý objem.

Infuzní přípravky

Postup zkoušky. Zkouší se jedna jednotka zkoušeného infuzního přípravku. Infuzní tekutina se přemístí do suchého odměrného válce tak velikého, aby objem měřené tekutiny zaplnil nejméně 40 % jmenovitého objemu válce. Změří se objem infuzní tekutiny zkoušeného infuzního přípravku.

Hodnocení. Infuzní přípravek vyhovuje zkoušce na využitelný objem, jestliže stanovený objem není menší než jmenovitý objem.

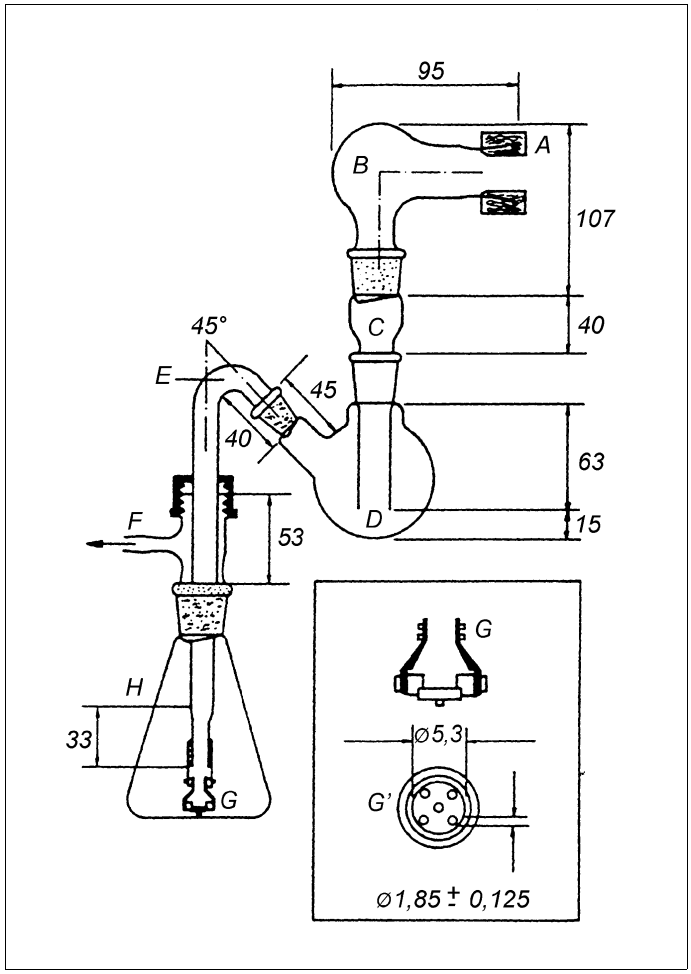
2.9.18 Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic

Podstata zkoušky. Zkouškou se stanovuje podíl jemných částic v aerodisperzích vytvářených přípravky k inhalaci.

Pokud není uvedeno a schváleno jinak, použijí se ke zkoušce níže uvedené přístroje a zkušební postupy.

Přístroj A (skleněný odlučovač částic)

Přístroj je vyobrazen na obr. 2.9.18-1, viz i tab. 2.9.18-1.



Obr. 2.9.18-1 Přístroj A pro aerodynamické stanovení jemných částic
Rozměry v milimetrech

Tab. 2.9.18-1

Označení	Předmět	Popis	Rozměry*
A	nástavec pro aplikátor	tvarovaný gumový nástavec pro zasunutí aplikátoru s ventilem	
B	vstupní hrdlo	upravená baňka s kulatým dnem *vstupní otvor se zábrusem* *kónická výpust se zábrusem*	50 ml 29/32 24/29
C	spojovací hrdlo	tvarovaný skleněný nástavec *vstupní otvor se zábrusem* *kónická výpust se zábrusem* spodní část výpusti ve tvaru trubičky o vybrané světlosti *vnitřní průměr* tenkostěnná skleněná trubička *vnější průměr*	 24/29 24/29 14 17
D	horní odlučovací komora	upravená baňka s kulatým dnem *vstupní otvor se zábrusem* *kónická výpust se zábrusem*	100 ml 24/29 24/29
E	spojovací trubička	středně silná skleněná trubička *skleněný kónický zábrus* ohnutý a horní svislý díl *vnější průměr* spodní svislý díl *vnější průměr*	 14/23 13 8
F	šroubový uzávěr, postranní rameno s nástavcem	plastický šroubový uzávěr silikonový gumový kroužek podložka z PTFE skleněný závit, *velikost* postranní výpust k odsávacímu zařízení *minimální průměr otvoru*	28/13 28/11 28/11 28 5
G	soubor spodní trysky	upravený polypropylenový držák filtru spojený se spodní svislou částí spojovací trubice pomocí spojky z PTFE plastový disk s otvory pro 4 trysky sestavené v kruhu o průměru 5,3 mm okolo distančního výstupku *průměr výstupku* *výška výstupku*	viz obr. 2.9.18-1 10 2 2
H	spodní odlučovací komora	kónická baňka *vstupní otvor se zábrusem*	250 ml 24/29

* Rozměry v milimetrech, není-li uvedeno jinak.

Postup pro rozprašovače

Do horní odlučovací komory se odměří 7 ml, do dolní 30 ml vhodného rozpouštědla.

Všechny součásti přístroje se spojí a ověří se, zda je řádně upevněný přístroj ve svislé poloze a zda se rozpěrný výstupek trysky dolní tryskové soustavy právě dotýká dna spodní odlučovací komory. K výpusti přístroje se připojí vhodné odsávací zařízení opatřené filtrem o přiměřené velikosti pórů a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby na přívodu protékalo hrdlem (60 ± 5) litrů vzduchu/min. Nádržka rozprašovače se naplní tekutým přípravkem k inhalaci a pomocí nástavce (adaptéru) se k přístroji připojí k tomu uzpůsobený aplikátor.

Pak se zapne odsávací zařízení a po 10 s i rozprašovač. Není-li uvedeno jinak, rozprašovač se po 60 s vypne, počká se asi 5 s a pak se vypne i odsávací zařízení přístroje. Potom se přístroj rozebere a po omytí vnitřního povrchu horní odlučovací komory se promývací tekutina převede do odměrné baňky. Pak se omyje vnitřní povrch spodní odlučovací komory a promývací tekutina se převede do jiné odměrné baňky. Nakonec se promyje filtr před odsávacím zařízením a jeho spojení s dolní odlučovací komorou a takto získaná tekutina se připojí k promývací tekutině získané promytím spodní odlučovací komory. V každé z obou baněk s promývací tekutinou se stanoví obsah účinné složky. Výsledky získané z obou částí přístroje se samostatně vyjádří v procentech vztažených na celkové množství účinné složky.

Postup pro tlakové inhalátory

Nástavec (adaptér) pro připojení tlakového ventilu se posune ke konci hrdla, takže když se aplikátor ventilu zasune do hloubky asi 10 mm, má souhlasnou polohu s horizontální osou hrdla a konec ventilu s tlakovou nádobkou směřuje nahoru a shodně s celým přístrojem leží ve vertikální rovině.

Do horní odlučovací komory se odměří 7 ml, do dolní 30 ml vhodného rozpouštědla.

Všechny součásti přístroje se spojí a ověří se, zda je řádně upevněný přístroj ve svislé poloze a zda se rozpěrný výstupek trysky dolní tryskové soustavy právě dotýká dna spodní odlučovací komory. K výpusti přístroje se připojí vhodné odsávací zařízení a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby na přívodu protékalo hrdlem (60 ± 5) litrů vzduchu/min.

Dávkovací ventil se připraví k činosti tak, že se tlakovým inhalátorem třepe po dobu 5 s a jedna dávka se odstřikne stranou. Nejdříve po 5 s se inhalátorem znovu třepe a opět se odstřikne jedna dávka. To se opakuje ještě třikrát.

Pak se třepe asi 5 s, zapne se odsávací zařízení a po zasunutí aplikátoru nasazeného na ventil do nástavce (adaptéru) se hned vystřikne jedna dávka. Sestavený inhalátor se potom oddělí od nástavce, třepe se jím po dobu nejméně 5 s, znovu se zakončení aplikátoru spolu s ventilem vrátí do nástavce a opět se vystřikne jedna dávka. Postup při vystřikování jednotlivých dávek se zopakuje ještě osmkrát, přičemž se pokaždé před vystřiknutím dávky třepe inhalátorem. Po vystřiknutí desáté dávky se čeká nejméně 5 s a odsávací zařízení se vypne. Potom se přístroj rozloží.

Vnitřní povrch přívodní trubice do horní odlučovací komory a její vnější povrch zasahující do komory se omyjí vhodným rozpouštědlem a promývací tekutina se shromáždí v dolní odlučovací komoře. V tomto roztoku se stanoví obsah účinné složky. Vypočte se množství účinné složky shromážděné v dolní odlučovací komoře po uvedení ventilu v činnost a výsledky se vyjádří v procentech vztažených na dávku uvedenou na štítku.

Postup pro inhalátory prášku

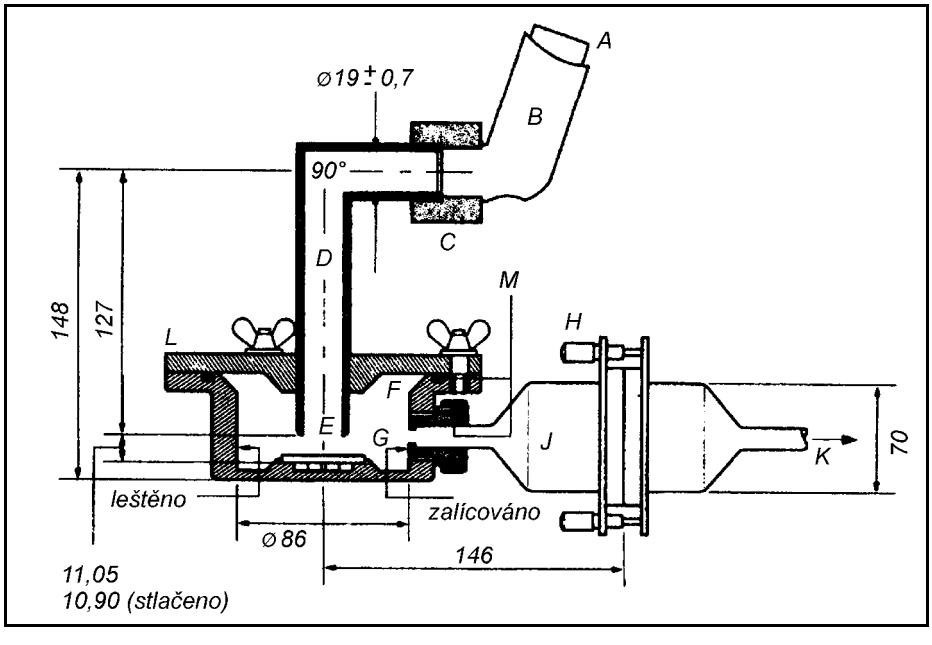
Do horní odlučovací komory se odměří 7 ml, do dolní 30 ml vhodného rozpouštědla.

Všechny součásti přístroje se spojí a ověří se, zda je řádně upevněný přístroj ve svislé poloze a zda se rozpěrný výstupek trysky dolní tryskové soustavy právě dotýká dna spodní odlučovací komory. Aniž by se na přístroj nasadil inhalátor, připojí se k výpusti přístroje vhodné odsávací zařízení a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby na přívodu protékalo hrdlem (60 ± 5) litrů vzduchu/min. Inhalátor se připraví k použití a pomocí vhodného spojovacího nástavce se k přístroji připojí aplikátor inhalátoru. Pak se na 5 s zapne odsávací zařízení. Po vypnutí odsávacího zařízení se inhalátor vyjme. Vystřiknutí se opakuje ještě devětkrát a potom se přístroj rozebere.

Vnitřní povrch přívodní trubice do dolní odlučovací komory a její vnější povrch zasahující do komory se omyjí vhodným rozpouštědlem, promývací tekutina se shromáždí v dolní odlučovací komoře a v roztoku se stanoví obsah účinné složky. Vypočte se množství účinné složky shromážděné po vystřiknutí v dolní odlučovací komoře a výsledky se vyjádří v procentech vztažených na dávku uvedenou na štítku.

Přístroj B (kovový odlučovač částic)

Přístroj je vyobrazen na obr. 2.9.18-2 a 2.9.18-3.



Obr. 2.9.18-2 Přístroj B pro aerodynamické stanovení jemných částic
Rozměry v milimetrech

A - tlaková nádobka inhalátoru
B - aplikátor
C - spojovací nástavec (adaptér)
D - hrdlo
E - tryska
F - odlučovací komora
G - kotouč ze slinutého skla (BS porozita č. 1)
H - upevnění filtru z nerezavějící oceli
J - skleněná filtrační sestava
K - odsávací zařízení
L - hliníkové víko odlučovací komory
M - kroužek gumového těsnění

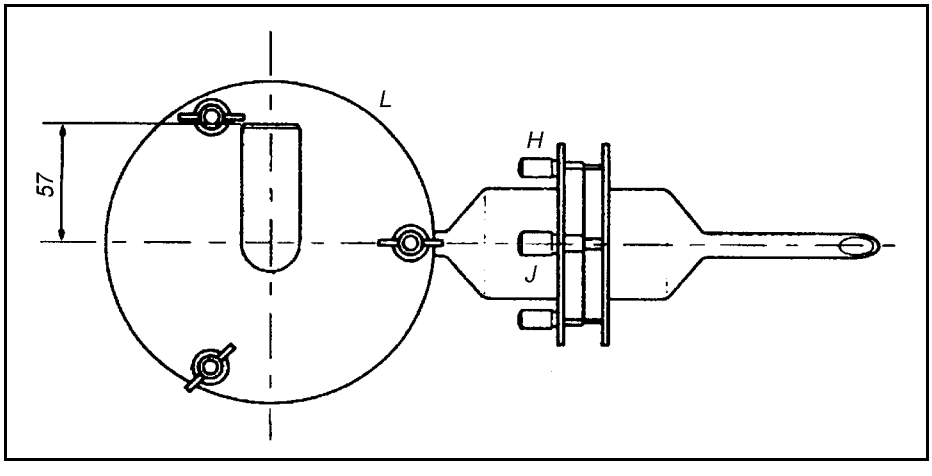
Postup pro rozprašovače

Usazování emitovaných kapiček se zkouší pomocí odlučovacího přístroje spojeného s naplněným rozprašovačem prostřednictvím vhodného spojovacího nástavce (adaptéru). Výpust přístroje vedoucí k odsávacímu zařízení je opatřena vhodným filtrem, např. o velikosti pórů 0,25 μm.

Při tomto postupu se pracuje se suchou odlučovací komorou. Všechny součásti přístroje se spojí a ověří se, zda je spodní část přístroje umístěna na rovné horizontální, řádně upevněné podložce. K výpusti přístroje se připojí vhodné odsávací zařízení a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby na přívodu procházelo hrdlem (60 ± 5) litrů vzduchu/min.

Nádržka rozprašovače se naplní tekutým přípravkem k inhalaci. Připraví se aplikátor a připojí se ke spojovacímu nástavci zařízení.

Zapne se odsávací zařízení přístroje a po 10 s se uvede do chodu rozprašovač. Po 60 s, není-li uvedeno jinak, se vypne rozprašovač a přibližně po dalších 5 s i odsávací zařízení a přístroj se rozebere. Pak se omyje vnitřní povrch hrdla i horní a spodní část komory a promývací tekutiny se převedou do odměrné baňky. Pak se vhodným rozpouštědlem promyje filtr a filtrační zařízení a tekutina se opět převede do vhodné odměrné baňky. V obou roztocích se stanoví obsah účinné složky. Výsledky se vyjádří samostatně pro obě části přístroje v procentech vztažených na celé množství účinné látky.



Obr. 2.9.18-3 Přístroj B pro aerodymanické stanovení jemných částic (pohled na vrchní desku shora)

Postup pro tlakové inhalátory

Spojovací nástavec (adaptér) pro nasazení ventilu se posune ke konci hrdla tak, že po nasazení aplikátoru má zařízení souhlasnou polohu s horizontální osou hrdla a konec ventilu s tlakovou nádobkou směřuje nahoru a shodně s celým přístrojem leží ve vertikální rovině.

Při tomto postupu se pracuje se suchou odlučovací komorou. Všechny součásti přístroje se spojí a ověří se, zda je spodní část přístroje umístěna na rovné horizontální, řádně upevněné podložce tak, že konec ventilu s tlakovou nádobkou je ve vertikální poloze. K výpusti přístroje se připojí vhodné odsávací zařízení a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby na přívodu procházelo hrdlem (60 ± 5) litrů vzduchu/min.

Dávkovací ventil se připraví k činnosti tak, že se tlakovým inhalátorem třepe po dobu 5 s a jedna dávka se odstraní odstříknutím. Nejdříve za 5 s se inhalátorem znovu třepe a opět se jedna dávka odstříkne. To se opakuje ještě třikrát.

Pak se tlakovým inhalátorem třepe po dobu asi 5 s, zapne se odsávací zařízení a bezprostředně po zasunutí aplikátoru s ventilem do nástavce (adaptéru) se vystříkne jedna dávka. Sestavený inhalátor se pak vysune ze spojovací části přístroje, opět se jím třepe asi 5 s a po opětném zasunutí konce aplikátoru s ventilem do spojovací části se vystříkne další dávka. Celý postup se opakuje ještě osmkrát, vždy po protřepání mezi jednotlivými dávkami. Po vystříknutí desáté dávky se počká asi 5 s a odsávací zařízení se vypne. Přístroj se potom rozebere.

Filtr a filtrační zařízení se promyjí vhodným rozpouštědlem a stanoví se obsah účinné složky v promývacím roztoku. Pak se vypočte množství účinné složky získané z filtračního zařízení po uvedení ventilu do činnosti a výsledky se vyjádří v procentech vztažených na dávku uvedenou v označení na obalu.

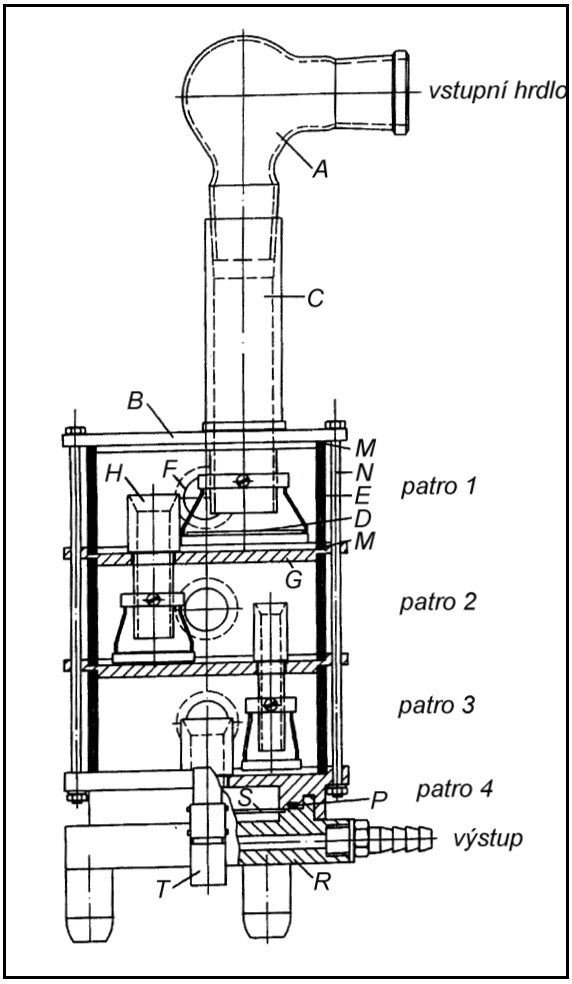
Postup pro inhalátory prášku

Do odlučovací komory se odměří 25 ml vhodného rozpouštědla tak, aby pokrylo kotouč ze slinutého skla.

Všechny součásti přístroje se spojí a ověří se, zda je spodní část odlučovače částic umístěna na rovné horizontální, řádně upevněné podložce. Aniž by se zasunul inhalátor, připojí se k výpusti přístroje vhodné odsávací zařízení a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby na přívodu procházelo hrdlem (60 ± 5) litrů vzduchu/min.

Inhalátor se připraví k použití a pomocí vhodného spojovacího nástavce (adaptéru) se k přístroji připojí aplikátor. Potom se na 5 s zapne odsávací zařízení. Po vypnutí odsávání se inhalátor vyjme. Vystříkne se dalších devět dávek a přístroj se rozebere.

Filtrační zařízení se včetně filtru promyje vhodným rozpouštědlem a v roztoku se stanoví obsah účinné složky. Poté se vypočte množství účinné složky získané po vystříknutí z filtračního zařízení a výsledky se vyjádří v procentech vztažených na dávku účinné složky uvedenou v označení na obalu.

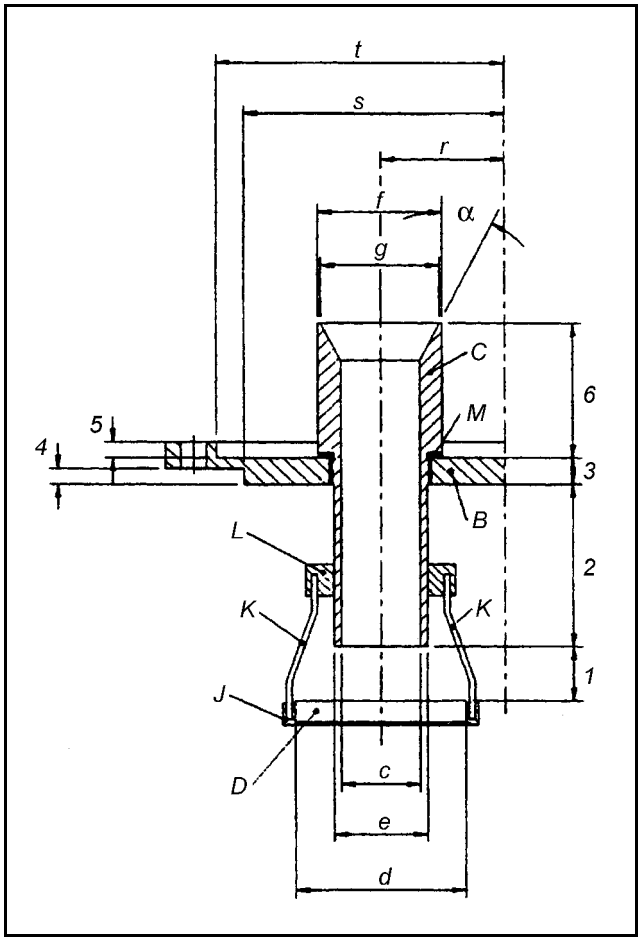


Obr. 2.9.18-4 Přístroj C pro aerodynamické stanovení jemných částic

Přístroj C (vícestupňový kapalinový odlučovač)

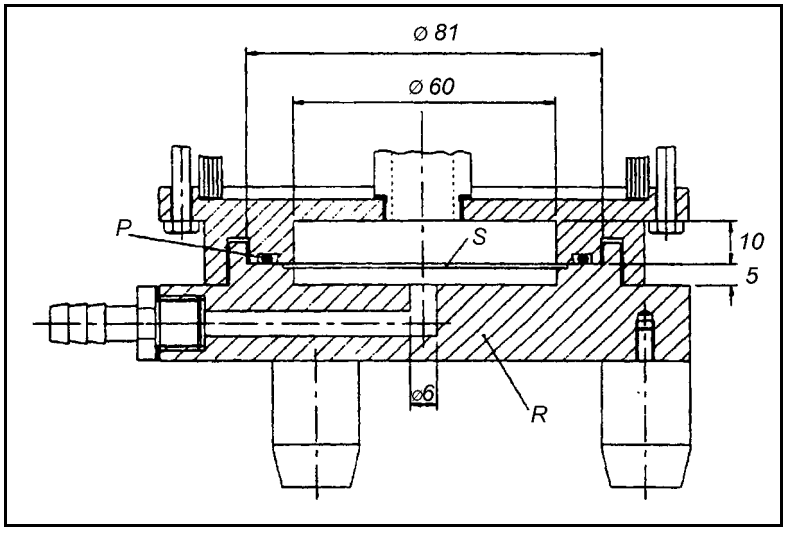
Přístroj je vyobrazen na obr. 2.9.18-4, 2.9.18-5 a 2.9.18-6.

Přístroj se skládá ze skleněného vstupního hrdla (A), ze třech odlučovacích pater (1, 2 a 3) a z filtračního patra (4), které s nimi tvoří celek.



Obr. 2.9.18-5 Detaily přístroje C

K odlučovacímu patru patří horní kovová přepážka (B), kterou prochází vstupní kovová trubice (C) s odlučovací deskou (D), skleněný válec (E) opatřený kontrolním okénkem (F), tvořící svislou stěnu patra, a vodorovná spodní kovová přepážka (G), kterou prostupuje trubice (H) spojující patro s nejbližším nižším patrem. Odlučovací deska (D) je zajištěna kovovým rámem (J) upevněným dvěma dráty k objímce (L) na přepadové trubce (C). Vodorovný povrch sběrné desky je kolmý k ose přepadové trubky. Sběrné desky mají soustředné uspořádání. Horní povrch odlučovací desky poněkud převyšuje okraj kovového rámu. Vybrání podél obvodu vodorovné příčky slouží ke správnému umístění skleněného válce. Skleněné válce jsou v přepážkách zajištěny těsněním (M) a dohromady jsou sepnuty šesti svorníky (N). Kontrolní okénka jsou uzavřena zátkami. Spodní strana nižší přepážky třetího patra má soustředný výstupek opatřený gumovým kroužkem, který utěsňuje okraj filtru zachycený v držáku filtru. Držák filtru (R) je konstruován jako miska se soustředným vybráním, v němž je zapuštěna perforovaná podpěra filtru (S). Soustava odlučovacích pater je sepnuta s držákem filtru pomocí dvou úchytných uzávěrů (T). Držák filtru je upraven pro filtry o průměru 7,6 mm. Podrobnosti a rozměry přístroje ukazují tabulky 2.9.18-2 a 2.9.18-3.



Obr. 2.9.18-6 Detaily filtračního patra přístroje C (4. patro)
Rozměry v milimetrech

Postup pro rozprašovače

Do každého ze tří horních pater přístroje se odměří 20 ml vhodného rozpouštědla. Na patro č. 4 se položí vhodný filtr a přístroj se sestaví. Na konec vstupního hrdla se upevní vhodný nástavec (adaptér) do takové polohy, aby konec aplikátoru rozprašovače byl po zasunutí ve vodorovné poloze shodné s osou hrdla a rozprašovač byl v poloze odpovídající jeho použití. Výpust přístroje se spojí s vhodným odsávacím zařízením a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby vstupem do hrdla procházelo (60 ± 5) litrů vzduchu/min. Pak se průtok vzduchu vypne.

Nádržka vhodného rozprašovače se naplní tekutým přípravkem k inhalaci a rozprašovač se připraví k činnosti. Aplikátor rozprašovače se připojí ke spojovacímu nástavci (adaptéru) přístroje.

Deset sekund po zapnutí odsávacího zařízení se zapne rozprašovač. Za 60 s, není-li uvedeno jinak, se rozprašovač vypne a asi po 5 s se vypne průtok vzduchu přístrojem.

Čtvrté patro přístroje se rozebere, opatrně se vyjme filtr, vloží se do nádobky s rozpouštědlem a účinná složka se rozpouštědlem vyextrahuje. Pak se z přístroje vyjme vstupní hrdlo a spojovací část pro aplikátor, rovněž se vloží do nádobky s rozpouštědlem a účinná složka se opět vyextrahuje. Vnitřek trubičky vedoucí na první patro se propláchne rozpouštědlem, které je na prvním patře a které se pak nechá stéci na patro zpět. Účinná složka se pak vyextrahuje i z vnitřních stěn a sběrných desek všech tří horních pater přístroje vždy do roztoku, který je na daném patře tak, že se přístroj naklání a otáčí, přičemž je třeba dbát na to, aby tekutina nepřetekla na jiné patro.

Za použití vhodné analytické metody se stanoví množství účinné složky obsažené v každém z pěti objemů roztoku. Použitá metoda musí přitom umožnit provedení korekce na odpařené rozpouštědlo.

Vypočte se množství účinné složky zachycené na každém ze čtyř pater a ve vstupním hrdle a výsledky se vyjádří v procentech vztažených na celé množství. Lze též kombinovat výsledky získané z 3. a 4. patra a výsledky ze vstupního hrdla s výsledky 1. a 2. patra.

Tab. 2.9.18-2 Detaily přístroje C

Označení*	Předmět	Popis	Rozměry**
A	vstupní hrdlo	upravená baňka s kulatým dnem *vstupní otvor se zábrusem* *kónická výpust se zábrusem* *délka od vstupu k zakulacení*	50 ml 29/32 29/32 95
B, G	vodorovná kovová přepážka	kruhová kovová deska *průměr* *tloušťka*	 120 viz tab. 2.9.18-3
C, H	tryska	kovová trubice zašroubovaná do kovové přepážky, zajištěná těsněním, s leštěným vnitřním povrchem	viz tab. 2.9.18-3
D	odlučovací deska	disk ze slinutého skla, porozita O *průměr*	 viz tab. 2.9.18-3
E	skleněný válec	skleněná leštěná trubička *výška včetně těsnění* *vnější průměr* *tloušťka stěny* *kontrolní okénko (F), průměr*	 46 100 3,5 18
J	kovový rám	kruhový rám profilu L se zářezem *vnitřní průměr* *výška* *tloušťka horizontální části* *tloušťka vertikální části*	 pro zachycení odluč. desky 4 0,5 2
K	drát	ocelový drát spojující kovový rám a objímku (dva pro každý rám) *průměr*	 1
L	objímka	kovová objímka šroubem připojená k trysce *vnitřní průměr* *výška* *tloušťka*	 vhodný k upevnění trysky 6 5
N	svorník	kovový svorník se 6 páry matic *délka* *průměr*	 157 4
P	kroužek O	gumový kroužek *průměr* *tloušťka*	 66,34 2,62
R	držák filtru	kovové pouzdro s podstavcem a výpustí	viz obr. 2.9.18-6
S	podpěra filtru	perforovaná kovová destička *průměr* *průměr otvoru* *vzdálenost mezi středy otvorů*	 65 3 4

* Vztahuje se na obr. 2.9.18-4 až 2.9.18-6.
** Rozměry v milimetrech, pokud není uvedeno jinak.

Tab. 2.9.18-3 Rozměry[1)] trysky s usazovací deskou přístroje C

Druh	Označení[2)]	1. patro	2. patro	3. patro	Filtrační patro (4.)
vzdálenost	1	9,5	5,5	4,0	n[3)]
	2	26	31	33	0
	3	8	5	5	5
	4	3	3	3	n
	5	0	3	3	3
	6[4)]	90	25	25	25
průměr	c	25	14	8	14
	d	50	30	20	n
	e	27,9	16,5	10,5	n
	f	32	22	14	22
	g	27,5	21	13	21
poloměr[5)]	r	16	22	27	0
	s	46	46	46	n
	t	n	50	50	50
úhel (konus)	α	2,86° (1/10)	26,5° (1/2)	26,5° (1/2)	26,5° (1/2)

1) Rozměry v milimetrech, pokud není uvedeno jinak.
2) Vztahuje se k obr. 2.9.18-5.
3) n: nevztahuje se na tuto položku.
4) včetně těsnící vložky
5) Vztahuje se na střed komory.

Postup pro tlakové inhalátory

Na každé ze třech horních pater přístroje se odměří 20 ml vhodného rozpouštědla. Na čtvrté patro se vloží vhodný filtr a přístroj se sestaví. Na konec vstupního hrdla se upevní vhodný spojovací nástavec (adaptér) tak, aby aplikátor ventilu byl po zasunutí ve vodorovné poloze shodné s osou hrdla a aby celý inhalátor byl v postavení odpovídajícím předpokládanému použití. Výpust přístroje se spojí s vhodným odsávacím zařízením a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby vstupem do hrdla procházelo (60 ± 5) litrů vzduchu/min. Pak se průtok vzduchu vypne.

Dávkovací ventil se připraví k činnosti třepáním inhalátorem do pobu 5 s a jednorázovým odstříknutím. Nejméně po 5 s se opět inhalátorem třepe a opět se odstříkne jedna dávka. To se pak opakuje ještě třikrát.

Při vlastní zkoušce se tlakovým inhalátorem třepe po dobu asi 5 s, zapne se k přístroji připojené odsávací zařízení, konec aplikátoru ventilu se zasune do spojovací části a hned nato se vystříkne jedna dávka. Sestavený inhalátor se pak vyjme ze spojovacího nástavce přístroje, opět se jím třepe 5 s a po opětném zasunutí aplikátoru ventilu do spojovacího nástavce se vystříkne další dávka. Celý postup se opakuje ještě osmkrát, vždy po protřepání mezi jednotlivými dávkami. Po vystříknutí desáté dávky se počká asi 5 s a odsávací zařízení se vypne.

Čtvrté patro přístroje se rozebere, opatrně se vyjme filtr, vloží se do nádobky s rozpouštědlem a účinná složka se rozpouštědlem vyextrahuje. Pak se z přístroje vyjme vstupní hrdlo a spojovací nástavec pro aplikátor, rovněž se vloží do nádobky s rozpouštědlem a účinná složka se vyextrahuje. Vnitřek trubky vedoucí na první patro se propláchne rozpouštědlem, které je na prvním patře. To se pak nechá stéci na první patro zpět. Účinná složka se potom vyextrahuje i z vnitřních stěn a ze

sběrných desek všech tří horních pater přístroje vždy do roztoku, který je na příslušném patře, tak, že se přístroj naklání a otáčí, přičemž je třeba dbát na to, aby tekutina nepřetekla na jiné patro.

Za použití vhodné analytické metody se stanoví množství účinné složky obsažené v každém z pěti objemů rozpouštědla. Použitá metoda má přitom umožnit provedení korekce na odpařené rozpouštědlo.

Vypočte se hmotnost usazené účinné složky, která se po vystříknutí dávky zachytila na patře 4, na patrech 3 + 4, na patrech 2 + 3 + 4, na patrech 1 + 2 + 3 + 4 a na patrech 1 + 2 + 3 + 4 + ve vstupním hrdle + na spojovacím nástavci (celková dávka, která se dostala do přístroje vystříknutím).

Lze též provést analýzu pouze dvou objemů rozpouštědla, totiž ze třetího a čtvrtého patra, a pak stanovit množství účinné složky zachycené při vystříknutí na patrech 3 + 4 a výsledky vyjádřit v procentech vztažených na dávku uvedenou v označení na obalu.

Postup pro inhalátory prášku

Do každého ze tří horních pater přístroje se odměří 20 ml vhodného rozpouštědla. Na čtvrté patro se vloží vhodný filtr a přístroj se sestaví. Na konec vstupního hrdla se upevní vhodný spojovací nástavec (adaptér) tak, aby aplikátor inhalátoru byl po zasunutí ve vodorovné poloze shodné s osou hrdla a aby celý inhalátor byl v postavení odpovídajícím předpokládanému použití. Před napojením inhalátoru se výpust přístroje spojí s vhodným odsávacím zařízením a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby vstupem do hrdla procházelo (60 ± 5) litrů vzduchu/min. Pak se průtok vzduchu vypne.

Inhalátor se připraví k použití a jeho aplikátor se připojí k přístroji pomocí vhodného spojovacího nástavce (adaptéru). Pak se na 5 s zapne odsávací zařízení. Odsávací zařízení se pak vypne a inhalátor se vyjme. To se potom opakuje pro dalších devět dávek.

Čtvrté patro přístroje se rozebere, opatrně se vyjme filtr, vloží se do nádobky s rozpouštědlem a účinná složka se rozpouštědlem vyextrahuje. Pak se z přístroje vyjme přístupní hrdlo a spojovací nástavec pro aplikátor, rovněž se vloží do nádobky s rozpouštědlem a účinná složka se vyextrahuje. Vnitřek trubky vedoucí na první patro se propláchne rozpouštědlem, které je na prvním patře. To se pak nechá stéci zpět na patro. Účinná složka se pak vyextrahuje i z vnitřních stěn a sběrných desek všech třech horních pater přístroje vždy do roztoku, který je na příslušném patře tak, že se přístroj naklání a otáčí, přičemž je třeba dbát na to, aby tekutina nepřetekla na jiné patro.

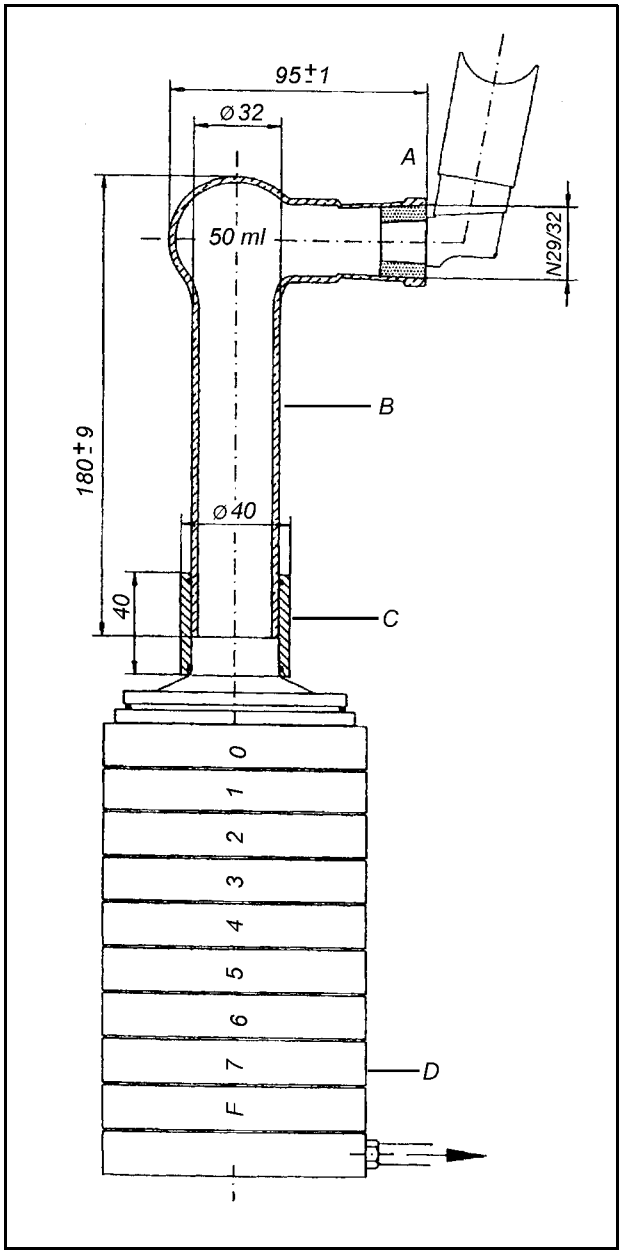
Za použití vhodné analytické metody se stanoví množství účinné složky obsažené v každém z pěti objemech rozpouštědla. Použitá metoda má umožnit provedení korekce na odpařené rozpouštědlo. To může zahrnovat použití vnitřního standardu nebo použití kvantitativního přenosu, po němž následuje zředění na stanovený objem.

Vypočte se hmotnost usazené účinné složky, která se po vystříknutí dávky zachytila na patře 4, na patrech 3 + 4, na patrech 2 + 3 + 4, na patrech 1 + 2 + 3 + 4 a na patrech 1 + 2 + 3 + 4 + ve vstupním hrdle + ve spojovacím nástavci (celková dávky, která se dostala do přístroje vystříknutím).

Lze též provést analýzu pouze dvou objemů rozpouštědla, ze třetího a ze čtvrtého patra, a množství účinné složky zachycené po vystříknutí na patrech 3 + 4 vyjádřit v procentech vztažených na dávku uvedenou v označení na obalu.

Přístroj D (vícestupňový kaskádový odlučovač)

Vhodnou sestavu vícestupňového kaskádového odlučovače, na který se vztahuje níže uvedený text, ukazuje obr. 2.9.18-7. Může se však použít i jiného vhodného přívodu.



Obr. 2.9.18-7 Přístroj D pro aerodynamické stanovení jemných částic
Rozměry v milimetrech

Tab. 2.9.18-4 Součásti přístroje D

Označení	Předmět	Popis	Rozměry*
A	nástavec pro aplikátor	upravený gumový nástavec pro aplikátor s ventilem	
B	hrdlo**	upravená kulatá baňka *zabroušené skleněné hrdlo*	50 ml 29/32
C	nástavec	plastická trubička	
D	vícestupňový kaskádový odlučovač	popis výrobce	

* Rozměry v milimetrech, pokud není uvedeno jinak.
** Vhodný vstupní otvor je na obr. 2.9.18-7. Je však možné použít různou úpravu.

Postup pro tlakové inhalátory

Sestaví se vícestupňový kaskádový odlučovač a ověří se, zda je celý systém vzduchotěsný. Pak se připojí odsávací zařízení a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, že se měří průtok při vstupu do hrdla, jak je to předepsáno pro daný přístroj. Odsávací zařízení se vypne.

K zabroušené skleněné objímce na konci hrdla přístroje se připojí tvarově přizpůsobený nástavec tak, že aplikátor ventilu bude po zasunutí do nástavce ve stejné linii s horizontální osou hrdla a jeho otevřený konec pro připojení nádobky bude směřovat nahoru ve svislé rovině shodné s celým přístrojem.

Dávkovací ventil se připraví k činnosti třepáním po dobu 5 s a odstříknutím jedné dávky. Přibližně po 5 s se znovu třepe a odstříkne. To se opakuje ještě třikrát.

Pak se inhalátorem třepe asi 5 s, zapne se odsávací zařízení přístroje, aplikátor se zasune do těsnícího nástavce a hned se vystříkne jedna dávka. Sestavený inhalátor se potom oddělí od nástavce, protřepává se opět asi 5 s, znovu se připojí konec aplikátoru k těsnícímu nástavci přístroje a opět se vystříkne. Celý proces se opakuje ještě osmkrát, přičemž se pokaždé mezi vystříknutím dávky inhalátorem třepe. Po desáté dávce se počká alespoň 5 s a odsávací zařízení se vypne. Přístroj se pak rozebere.

Gumový těsnící nástavec a vnitřek hrdla se promyjí vhodným rozpouštědlem a shromáždí se promývací tekutina.

Usazenina na každém patře se rovněž opláchne vhodným rozpouštědlem a obsah účinné složky se stanoví pro každé patro a pro hrdlo.

Postup pro inhalátory prášku

Je-li to třeba, pokryje se každá deska vhodnou tekutinou, například silikonovým olejem. Vícestupňový kaskádový odlučovač se připojí k vhodnému předřazenému separátoru a ověří se, zda je celý systém vzduchotěsný. Aniž by byl připojen inhalátor, spojí se přístroj s odsávacím zařízením a průtok vzduchu přístrojem se upraví tak, aby při vstupu do hrdla odpovídal požadavkům kladeným na přístroj. Odsávací zařízení se potom vypne.

Inhalátor se připraví k použití a jeho aplikátor se napojí na přístroj pomocí vhodného těsnícího nástavce. Pak se na 5 s zapne odsávací zařízení. To se potom vypne a inhalátor se vyjme. Celý postup se opakuje pro dalších devět dávek. Nato se přístroj rozebere.

Zbytky zachycené na jednotlivých odlučovacích patrech se vypláchnou vhodným rozpouštědlem. Obsah účinné složky se pak stanoví samostatně pro každé patro a pro hrdlo přístroje.

2.9.19 Hodnocení kontaminace částicemi pod hranicí viditelnosti

Podstata zkoušky. K hodnocení částic menších, než jsou částice viditelné, se použije vhodný přístroj, který na principu blokování světla umožňuje automatické stanovení velikosti částic přítomných v roztoku a počtu částic podle velikosti.

Přístroj se kalibruje *disperzemi sférických částic CRL* známých velikostí mezi 5 µm a 25 µm. Tyto standardní částice se dispergují ve *vodě prosté částic R* a je nutné dát pozor, aby nedošlo k jejich shlukování.

Hodnocená kontaminace injekcí a infuzí je tvořena nezáměrně přítomnými cizorodými, pohyblivými a nerozpuštěnými částicemi, jinými než plynové bubliny v roztocích.

Obecná opatření. Zkouška se provádí za podmínek omezujících kontaminaci částicemi, přednostně ve skříni s laminárním prouděním vzduchu.

Čisté laboratorní sklo prosté částic lze získat pečlivým vymytím potřebného skla a filtračního zařízení bez membránových filtrů teplým roztokem detergentu a propláchnutím velkým množstvím *vody R*, aby se odstranily všechny stopy detergentu. Bezprostředně před vlastním použitím se omyje nádobí a příslušné části zařízení shora dolů, nejdříve zvenku a pak zevnitř *vodou prostou částic R*. Se zkoušeným přípravkem se manipuluje opatrně, aby se nevnesly vzduchové bubliny, zejména při přemístění části přípravku do nádoby, v níž se uskutečňuje měření.

K ověření vhodnosti prostředí, v němž se zkouška uskutečňuje, čistoty nádob a kvality použité *vody prosté částic R* se uskuteční kontrolní zkouška. Při ní se hodnotí kontaminace částicemi v pěti vzorcích po 5 ml *vody prosté částic R* níže popsanou metodou. Jestliže počet částic velikosti 10 µm a větších přesahuje 25 pro spojených 25 ml, provozní podmínky zkoušky a další opatření nejsou dostatečné. Přípravné práce je nutné opakovat až do vyhovujících výsledků kontrolní zkoušky.

Postup zkoušky. Obsah vzorku v obalu se promíchá pětinásobným převrácením. Je-li třeba, opatrně se sejme pojistný uzávěr. Obal se zvnějšku očistí proudem *vody prosté částic R*. Odstraní se uzávěr, aniž by došlo ke kontaminaci hodnoceného obsahu. Plynové bubliny z přípravku se odstraní dvouminutovým stáním.

Odeberou se čtyři dávky, každá o objemu nejméně 5 ml a spočítá se počet částic o velikosti stejné nebo větší, jako je uvedeno v příslušném článku.

Hodnocení. Z hodnocení se vyřadí výsledek získaný u první dávky a vypočte se průměrný počet částic ve zkoušeném přípravku.

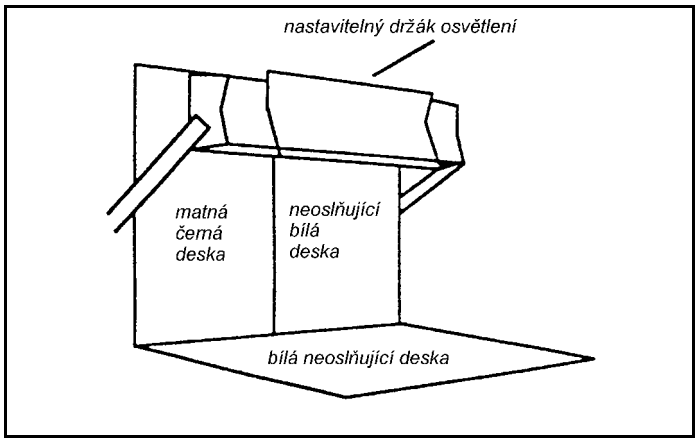
2.9.20 Hodnocení kontaminace viditelnými částicemi

Podstata zkoušky. Zkouška umožňuje jednoduchou detekci viditelných částic za níže popsaných podmínek. Provádí se ve shodě s ustanoveními SVP.

Hodnocená kontaminace injekcí a infuzí je tvořena nezáměrně přítomnými cizorodými, pohyblivými a nerozpuštěnými částicemi, jinými než plynové bubliny v roztocích.

Zařízení. Zařízením, viz obr. 2.9.20-1, je pozorovací jednotka, kterou tvoří následující části:

- matná černá deska o příslušné velikosti upevněná ve svislé poloze,
- neoslňující bílá deska o příslušné velikosti upevněná ve svislé poloze vedle černé desky,
- nastavitelný držák osvětlení s vhodným stínítkem, zdroj bílého světla a vhodný difuzor (pozorovací světlený zdroj se dvěma zářivkami 13 W, vhodná délka zářivky je 525 mm). Intenzita osvětlení v místě pozorování je udržována v rozmezí 2000 luxů až 3750 luxů, vyšší hodnoty jsou vhodnější pro nádoby z barevného skla a plastů.



Obr. 2.9.20-1 Zařízení pro pozorování viditelných částic

Postup zkoušky. Opatrně se rozvíří obsah každé pozorované nádoby nebo se nádoba opatrně obrátí, aby se netvořily vzduchové bubliny, a obsah se pozoruje asi 5 s proti bílé desce. Celý postup se opakuje před černou deskou.

2.9.21 Mikroskopické hodnocení kontaminace částicemi

Podstata zkoušky. Zkouška využívající mikroskopické pozorování představuje kvalitativní metodu sloužící k identifikaci přítomných částic a ke stanovení jejich charakteristik. Výsledky mohou vést k určení původu částic a výrobce pak může přijmout opatření k zamezení kontaminace těmito částicemi.

Částicová kontaminace injekcí a infuzí je tvořena nezáměrně přítomnými cizorodými, pohyblivými a nerozpuštěnými částicemi, jinými než plynové bubliny v roztocích.

Obecná opatření. Jednotlivé práce se uskutečňují ve skříni s laminárním prouděním vzduchu.

Příprava materiálů. Použité sklo a filtrační zařízení, kromě membránových filtrů, se pečlivě omyje teplým roztokem detergentu a pak se pečlivě opláchne dostatečným množstvím *vody R* k odstranění všech stop detergentu. Těsně před vlastním použitím se každé zařízení od shora dolů, nejprve zvenku a pak zevnitř opláchne *vodou prostou částic R*.

Přístroje. Použije se vakuové (podtlakové) filtrační zařízení z nerezové oceli nebo ze skla a membránový, mřížkovaný filtr vhodné barvy a velikosti pórů.

K pozorování lze použít binokulární mikroskop s vybavením:
- achromatický objektiv se zvětšením 10krát,
- okuláry se zvětšením 10krát, z nichž alespoň jeden je vybaven nitkovou sítí nebo jiným vhodným zařízením umožňujícím změření částic o velikosti 10 µm nebo větších,
- osvětlovací systém k pozorování v dopadajícím nebo odraženém světle,
- objektivní mikroměřítko ke kalibraci okulárové nitkové sítě.

Postup zkoušky

Příprava membránového filtru a filtračního zařízení. Nálevka a spodní část držáku filtru se opláchne *vodou prostou částic R.* Membránový filtr se uchopí předem omytými chemickými kleštěmi a opláchne se z obou stran *vodou prostou částic R.* Filtr je přitom držen ve svislé poloze a proudem vody se přejíždí dozadu a dopředu a shora dolů, aby se odstranily všechny částice. Opláchnutý filtr se vloží mřížkováním nahoru a dobře vystředěně na spodní část držáku filtru. Opatrně, bez klouzání po mřížkované straně membránového filtru, se připevní filtrační nálevka ke spodní části filtračního zařízení. Sestavená filtrační jednotka se obrátí nálevkou dolu a po dobu asi 15 s se oplachuje vnitřek nálevky a povrch filtru proudem *vody prosté částic R.* Filtrační jednotka se nasadí na filtrační baňku.

Filtrace vzorku. 25 ml homogenizovaného vzorku se vleje do filtrační nálevky a nechá asi 1 min odstát. V baňce se vytvoří podtlak a vzorek se přefiltruje. Po opatrném zrušení vakua se opláchnou vnitřní stěny nálevky proudem *vody prosté částic R.* Je třeba dát pozor, aby proud vody nezasahoval přímo povrch filtru. Když oplachová vody přestane vířit, přefiltruje se opět pomocí podtlaku. Vakuum se ještě chvíli ponechá k oschnutí filtru a pak se podtlak zruší. Opatrně se odstraní nálevka, filtr se uchopí chemickými kleštěmi omytými *vodou prostou částic R* a vloží do čisté Petriho misky. Na dolní část misky se vloží víčko tak, aby zůstala částečně odkryta, a filtr, ve skříni s laminárním prouděním vzduchu tak, aby mohl oschnout a nepomačkal se. Pak se miska položí na stolek mikroskopu a podle níže uvedeného návodu se sledují částice nacházející se na membránovém filtru.

Příprava kontrolního vzorku. Kontrolní vzorek se připravuje za stejných podmínek jako zkoušený vzorek a získá se po filtraci 25 ml *vody prosté částic R* ve filtračním zařízení.

Kalibrace mikroskopu. Nitková síť se kalibruje pomocí objektivního mikroměřítka (se známou velikostí dílků).

Stanovení. Vzorek se vyšetřuje vizuálním pozorováním nebo pomocí elektronického zapisovače (záznamu). Celý povrch filtru se pozoruje při stonásobném zvětšení a osvětlení pod dopadajícím nebo održeným světlem. Částice se počítají a zařazují do předem zvolených velikostních tříd, ≥ 10 μm. V každé třídě se odpočítá počet částic v kontrolním vzorku od počtu částic v hodnoceném vzorku. Obsahuje-li kontrolní vzorek více než pět částic velikosti 25 μm nebo větších, jsou provozní podmínky zkoušky nevyhovující a zkoušku je nutné opakovat, včetně přípravných prací.

Hodnocení

Kde lze, určí se typ nalezených částic a jejich charakteristiky. V případě potřeby se zaznamenají počty nalezených částic.

272

3 Obalový materiál a obaly

3.1 Materiály používané pro výrobu obalů

Na výrobu obalů pro farmaucetické použití se používají materiály popsané dále. Materiály neuvedené v lékopise jsou v každém jednotlivém případě schvalovány oprávněnou autoritou v rámci příslušného řízení (registračního, schvalovacího) přípravku v daném obalu.

3.1.1 Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro obaly na lidskou krev a krevní složky a pro obaly na vodné roztoky k intravenózní infuzi

Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu obsahují kromě vysokomolekulárního polymeru, který se získá polymerizací vinylchloridu, ještě různé přísady.

Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro obaly (vaky) na krev a krevní složky a pro obaly (vaky) na vodné roztoky k intravenózní infuzi jsou definovány povahou a poměry složek použitých při jejich výrobě.

Obsahují nejméně 55 % polyvinylchloridu a mohou obsahovat tyto přísady:
- nejvýše 40 % bis(2-ethylhexyl)ftalatu,
- nejvýše 1 % oktanoatu zinečnatého (2-ethylhexanoatu zinečnatého),
- nejvýše 1 % stearanu vápenatého nebo stearanu zinečnatého nebo 1 % jejich směsi,
- nejvýše 1 % N,N´-diacylethylendiaminů (acylem je zejména palmitoyl a stearoyl),
- nejvýše 10 % jednoho z následujících epoxidovaných olejů nebo 10 % jejich směsi:
  - epoxidovaný sójový olej s obsahem oxiranového kyslíku 6 % až 8 % a číslem jodovým nejvýše 6,
  - epoxidovaný lněný olej s obsahem oxiranového kyslíku nejvýše 10 % a číslem jodovým nejvýše 7.

K polymeru se nepřidává žádný antioxidant.

Pro barvení polymeru se použije pouze přísada ultramarínové modři. Žádné barvivo se nepřidává do polyvinylchloridu na výrobu obalů pro krev a krevní složky.

Vlastnosti

Prášek, kuličky, granule nebo průsvitné fólie různé tloušťky, bezbarvé až světle žluté.

Zkoušky totožnosti

V případě potřeby se vzorky zkoušeného materiálu rozřežou na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Ke 2,0 g zkoušeného materiálu se přidá 200 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a vaří se 12 h pod zpětným chladičem. Zbytek (*B*) a roztok (*A*) se oddělí filtrací.

Roztok (*A*) se odpaří do sucha za sníženého tlaku ve vodní lázni při 30 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v 10 ml *toluenu R* (roztok A_1). Zbytek (*B*) se rozpustí zahříváním na vodní lázni pod zpětným chladičem v 60 ml *dichlorethanu R* a zfiltruje se. Filtrát se přidá po kapkách a za silného třepání k 600 ml *heptanu R* zahřátého téměř k varu. Horká směs se zfiltruje horkým filtrem, aby se oddělil koagulát (B_1) a organický roztok. Organický roztok se ochladí na pokojovou teplotu, oddělí se vzniklá sraženina (B_2) a zfiltruje se zváženým filtrem ze slinutého skla (40).

A. Koagulát B_1 se rozpustí v 30 ml *tetrahydrofuranu R* a za stálého třepání se přidá po malých dávkách 40 ml *ethanolu R*. Filtrací se oddělí sraženina (B_3) a suší se ve vakuu při teplotě nejvý-

še 50 °C nad *oxidem fosforečným R* nebo *chloridem vápenatým bezvodým R*. Několik miligramů sraženiny B_3 se rozpustí v 1 ml *tetrahydrofuranu R*. Několik kapek získaného roztoku se nanese na destičku chloridu sodného a odpaří se do sucha v sušárně při teplotě 100 °C až 105 °C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) vysušené látky odpovídá spektru *polyvinylchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok A_1.
Porovnávací roztok. 0,8 g *bis(2-ethylhexyl)ftalatu CRL* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se *toluenem R* po dráze 15 cm. Vrstva se opatrně usuší a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku A_1 odpovídá polohou a fluorescencí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zbytku získaného ve zkoušce Bis(2-ethylhexyl)ftalat odpovídá spektru *bis(2-ethylhexyl)ftalatu CRL*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 5,0 g se převede do spalovací baňky, přidá se 30 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se do vzniku černé sirupovité hmoty. Ochladí se a opatrně se přidá 10 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R*. Směs se mírně zahřeje, nechá se ochladit a přidá se 1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R*; opakuje se střídavé odpařování a přidávání peroxidu vodíku do získání bezbarvé tekutiny. Objem tekutiny se sníží asi na 10 ml, ochladí se a zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Roztok S2. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla, přidá se 500 ml *vody R* a hrdlo baňky se překryje hliníkovou fólií nebo kádinkou z borokřemičitého skla. Zahřívá se 20 min v autoklávu na (121 ± 2) °C. Po zchladnutí se roztok sleje.

Vzhled roztoku S2. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S2 se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného BMF RS*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. Ke 100 ml roztoku S2 se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS*. K dosažení počátku barevného přechodu se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Absorbance (*2.2.25*). 100 ml roztoku S2 se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml *hexanu R*. Absorbance při 250 nm až 310 nm je nejvýše 0,25.

Redukující látky. Zkouška se provádí do 4 h od přípravy roztoku S2. Ke 20 ml roztoku S2 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Vaří se pod zpětným chladičem 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška s 20 ml *vody na injekce R*. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku je nejvýše 2,0 ml.

Primární aromatické aminy. Ke 2,5 ml roztoku A_1 připraveného pro zkoušky totožnosti se přidá 6 ml *vody R* a 4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*. Důkladně se protřepe, organická vrstva se oddělí a odstraní se. K vodné vrstvě se přidá 0,4 ml čerstvě připraveného roztoku *dusitanu sodného R* (10 g/l). Promíchá se a nechá 1 min stát. Přidá se 0,8 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (25 g/l), nechá se stát 1 min a přidá se 2 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l). Po 30 min není zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně a stejným způsobem za použití 1 ml roztoku *naftylaminu R* (0,01g/l) v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, 5 ml *vody R* a 4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0, mol/l RS* místo vodné vrstvy (20 µg/g).

Bis(2-ethylhexyl)ftalat. Hodnotí se chromatogram ze zkoušky Epoxidované oleje v ultrafialovém světle při 254 nm a vyznačí se na vrstvě silikagelu místo odpovídající bis(2-ethylhexyl)ftalatu. Silikagel z vyznačeného místa se sejme a protřepe se 40 ml *etheru R*. Kvantitativně se zfiltruje a odpaří do sucha; zbytek po odpaření je nejvýše 40 mg.

N,N′-diacylethylendiaminy. Sraženina B_2 získaná při zkouškách totožnosti se v odváženém filtru ze slinutého skla (40) promyje *ethanolem R*, suší se do konstantní hmotnosti nad *oxidem fosforečným R* a zváží se; zbytek váží nejvýše 20 mg.

Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zbytku odpovídá spektru *N,N -diacylethylendiaminů CRL*.

Epoxidované oleje. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy *silikagelu G R* o tloušťce 1 mm.

Na vrstvu se do pruhu (30 mm x 3 mm) nanese 0,5 ml roztoku A_1 získaného při zkouškách totožnosti a vyvíjí se *toluenem R* po dráze 15 cm. Vrstva se opatrně vysuší a vystaví se na 5 min parám jodu. Na chromatogramu se vyznačí pruh s hodnotou R_F 0, případně i druhý pruh s hodnotou R_F 0,7, které odpovídají epoxidovaným olejům. Silikagel na vyznačeném místě odpovídající pásu, případně pásům se sejme. Podobně se sejme silikagel v odpovídajícím místě jako kontrolní vzorek. Oba vzorky se 15 min třepou odděleně se 40 ml *methanolu R*. Oba zbytky se zfiltrují, vysuší a zváží. Rozdíl hmotností je nejvýše 10 mg.

Zaznamenají se infračervená absorpční spektra (*2.2.24*) obou zbytků. Spektrum zbytku zkoušeného vzorku odpovídá spektru *epoxidovaného oleje CRL* nebo *epoxidovaného lněného oleje CRL* nebo jejich směsi. V případě potřeby se berou v úvahu absorpční maxima kontrolního vzorku.

Vinylchlorid. Nejvýše 1 µg/g; stanoví se head space plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *etheru R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 10 µl *etheru R* se přidá mikrostříkačkou do 20,0 ml *dimethylacetamidu R* tak, aby špička jehly byla ponořena do rozpouštědla. Těsně před použitím se roztok zředí *dimethylacetamidem R* 1 : 1000.

Zkoušený roztok. 1,000 g zkoušeného materiálu se přenese do lahvičky pro opakovaný odběr na 50 ml a přidá se 10,0 ml roztoku vnitřního standardu. Lahvička se uzavře, uzávěr se zajistí a protřepe se, aniž by došlo ke smočení zátky kapalinou. Lahvička se temperuje 2 h ve vodní lázni při (60 ± 1) °C.

Základní roztok vinylchloridu. Připravuje se v digestoři. 50,0 ml *dimethylacetamidu R* se přenese do lahvičky na 50 ml. Lahvička se uzavře a zátka se zajistí. Lahvička se zváží s přesností 0,1 mg. Polyethylenová nebo polypropylenová injekční stříkačka na 50 ml se naplní plynným *vinylchloridem R*. Plyn se nechá ve stříkačce asi 3 min, stříkačka se vyprázdní a opět se naplní 50 ml plynného *vinylchloridu R*. Na stříkačku se nasadí injekční jehla a objem plynu ve stříkačce se zmenší z 50 ml na 25 ml. Těchto 25 ml vinylchloridu se pomalu nastříkne do lahvičky za opatrného třepání tak, aby nedošlo ke smočení jehly kapalinou. Lahvička se opět zváží. Přírůstek hmotnosti je asi 60 mg (1 µl takto připraveného roztoku obsahuje asi 1,2 µg vinylchloridu).

Standardní roztok vinylchloridu. K 1 objemovému dílu základního roztoku vinylchloridu se přidají 3 objemové díly *dimethylacetamidu R*.

Porovnávací roztoky. Do šesti lahviček pro opakovaný odběr na 50 ml se přenese po 10,0 ml roztoku vnitřního standardu. Lahvičky se uzavřou a zátky se zajistí. Do pěti lahviček se jednotlivě nastříkne 1 µl, 2 µl, 3 µl, 5 µl a 10 µl standardního roztoku vinylchloridu. Šest takto připravených roztoků obsahuje tedy 0 µg, asi 0,3 µg, asi 0,6 µg, asi 0,9 µg, asi 1,5 µg a asi 3 µg vinylchloridu. Lahvičky se opatrně protřepou tak, aby nedošlo ke smočení uzávěru roztokem, a temperují se 2 h ve vodní lázni při (60 ± 1) °C.

Chromatografický postup se provádí obvykle za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 3 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 5 % *dimethylstearamidu R* a 5 % *makrogolu 400 R,*
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 45 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C a teplota detektoru na 150 °C.

Provede se head space nástřik po 1 ml z každé lahvičky pro opakovaný odběr. Vypočte se obsah vinylchloridu.

Celkový fosfor. 0,25 g se žíhá v platinovém kelímku s 0,2 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a 50 mg *dusičnanu draselného R.* Po ochlazení se zbytek rozvolní *vodou R* a přenese se do 50ml odměrné baňky. Kelímek se vypláchne *vodou R*, která se přidá do odměrné baňky. K roztoku se přidává roztok *kyseliny sírové R* (60 %), dokud roztok šumí. Když roztok vyšumí, přidá se 25 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Žluté zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně smícháním 0,5 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (0,219 g/1000,0 ml), 10 ml *vody R* a 25 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R* a zředěním *vodou R* na 50,0 ml (100 µg/g).

Baryum. 2,0 g se žíhají v křemenném kelímku. Zbytek se rozvolní 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a na vodní lázni se odpaří do sucha. Tento zbytek se rozvolní dvěma dávkami po 1 ml *vody destilované R.* Zfiltruje se a přidají se 3 ml *síranu vápenatého RS.* Opalescence zkoušeného roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného z 1,2 ml základního *roztoku barya (50 µg Ba/ml)*, 0,8 ml *vody destilované R* a 3 ml *síranu vápenatého RS* (30 µg/g).

Kadmium. Nejvýše 0,6 µg Cd/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 10 ml roztoku S1 se odpaří do sucha. Zbytek se rozvolní 5 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 ml/l), zfiltruje se a filtrát se zředí stejným roztokem kyseliny na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se ze základního *roztoku kadmia (1 mg Cd/ml)* zředěním roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (10 ml/l).

Změří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Vápník. Nejvýše 700 µg Ca/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 2,0 g se žíhají v křemenném kelímku. Zbytek se rozvolní 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a na vodní lázni se odpaří do sucha. Tento zbytek se rozvolní 5 ml *vody R*, zfiltruje se a filtrát se zředí *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se ze základního *roztoku vápníku (400 µg Ca/ml)* zředěním *vodou R.*

Změří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Těžké kovy (*2.4.8*). K 10 ml roztoku S1 se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, až roztok mírně zrůžoví, a zředí se *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 µg/g). Porovnávací roztok se připraví ze základního *roztoku olova (2 µg Pb/ml).*

Cín. K 10 ml roztoku S1 se přidá 0,3 ml *kyseliny thioglykolové R* a 30 ml *vody R.* Po smíchání se přidají 2 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (10 g/l) a 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dithiolu R* (5 g/l) v *ethanolu R* a zředí se *vodou R* na 50 ml. Po 15 min není zbarvení roztoku

intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml roztoku *kyseliny sírové R* (200 ml/l) a 6 ml základního *roztoku cínu (5 µg Sn/ml)* (30 µg/g).

Zinek. 1 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 100 ml. K 10 ml roztoku se přidá 5 ml *tlumivého roztoku acetatového o pH 4,4*, 1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* a 5,0 ml roztoku *dithizonu R* (10 mg/l) v *chloroformu R* a protřepe se. Po 2 min není fialové zbarvení spodní vrstvy zkoušeného roztoku intenzivnější než zbarvení spodní vrstvy porovnávacího roztoku připraveného současně stejným postupem za použití 2 ml základního *roztoku zinku (10 µg Zn/ml)* a 8 ml *vody R* (2 mg/g). Provede se slepá zkouška s 10 ml *vody R*. Zkoušku nelze hodnotit, jestliže spodní vrstva získaná při slepé zkoušce je zelená.

Zbytek po odpaření. 50 ml roztoku S2 se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 7,5 mg (0,3 %).

Stanovení obsahu polyvinylchloridu

S 50,0 mg se provede spalování organických látek v kyslíku (*2.5.10*). Spalné produkty jsou absorbovány do 20 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*. K získanému roztoku se přidá 2,5 ml *kyseliny dusičné R*, 10,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 5 ml *síranu amonno-železitého RS2* a 1 ml *dibutylftalatu R*. Titruje se *thiokyanatanem amonným 0,05 mol/l VS* do červenožlutého zbarvení roztoku. Za stejných podmínek se provede slepá zkouška.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 6,25 mg polyvinylchloridu.

3.1.2 Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro hadičky používané v soupravách pro transfuzi krve a krevních složek

Obsahují nejméně 55 % polyvinylchloridu s bis(2-ethylhexyl)ftalatem jako změkčovadlem.

Vlastnosti

Téměř bezbarvý nebo světle žlutý materiál se slabým charakteristickým pachem. Při spalování vzniká hustý černý a štiplavý dým.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,5 g se přidá 30 ml *tetrahydrofuranu R*. Zahřívá se 10 min za míchání na vodní lázni v digestoři. Materiál se zcela rozpustí. Za míchání se po kapkách přidává *methanol R* a vzniklá zrnitá sraženina se odfiltruje a vysuší při 60 °C. Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) sraženiny. 50 mg sraženiny se rozpustí ve 2 ml *tetrahydrofuranu R* a naleje se na sklíčko. Sklíčko se vysuší v sušárně při 80 °C, film se sejme a upevní v držáku spektrometru. Infračervené absorpční spektrum sraženiny se shoduje se spektrem *polyvinylchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Ke 2 g zkoušeného materiálu se přidá 200 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a vaří se 12 h pod zpětným chladičem. Filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku na vodní lázni při 30 °C. Zbytek se rozpustí v 10 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 0,8g *diethylhexylftalatu CRL* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se *toluenem R* po dráze 15 cm. Vrstva se opatrně usuší a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a fluorescencí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká roztokem *fluoresceinu sodné soli R* (0,5 g/l) a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na startu chromatogramu zkoušeného roztoku je jedna skvrna.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 5,0 g se převede do spalovací baňky, přidá se 30 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se do vzniku černé sirupovité hmoty. Ochladí se a opatrně se přidá 10 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R.* Směs se mírně zahřeje, nechá se ochladit a přidá se 1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R*; opakuje se střídavé odpařování a přidávání peroxidu vodíku do získání bezbarvé tekutiny. Objem tekutiny se sníží asi na 10 ml, ochladí se a zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Roztok S2. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla, přidá se 500 ml *vody R* a hrdlo baňky se překryje hliníkovou fólií nebo kádinkou z borokřemičitého skla. Zahřívá se 20 min v autoklávu na (121 ± 2) °C. Po zchladnutí se roztok sleje.

Vzhled roztoku S2. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*). Je prakticky bez pachu.

Vinylchlorid. Nejvýše 1 µg/g; stanoví se head space plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *etheru R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 10 µl *etheru R* se přidá injekční mikrostříkačkou do 20,0 ml *dimethylacetamidu R* tak, aby špička jehly byla ponořena do rozpouštědla. Těsně před použitím se roztok zředí *dimethylacetamidem R* 1 : 1000.
Zkoušený roztok. 1,000 g zkoušeného materiálu se přenese do lahvičky pro opakovaný odběr na 50 ml a přidá se 10,0 ml roztoku vnitřního standardu. Lahvička se uzavře, uzávěr se zajistí a protřepe se, aniž by došlo ke smočení zátky kapalinou. Lahvička se temperuje 2 h ve vodní lázni při (60 ± 1) °C.
Základní roztok vinylchloridu. Připravuje se v digestoři. 50,0 ml *dimethylacetamidu R* se převede do lahvičky na 50 ml. Lahvička se uzavře a zátka se zajistí. Lahvička se zváží s přesností 0,1 mg. Polyethylenová nebo polypropylenová injekční stříkačka na 50 ml se naplní plynným *vinylchloridem R.* Plyn se nechá ve stříkačce asi 3 min, stříkačka se vyprázdní a opět se naplní 50 ml plynného *vinylchloridu R.* Na stříkačku se nasadí injekční jehla a objem plynu ve stříkačce se zmenší z 50 ml na 25 ml. Těchto 25 ml vinylchloridu se pomalu nastříkne do lahvičky za opatrného třepání tak, aby nedošlo ke smočení jehly kapalinou. Lahvička se opět zváží. Přírůstek hmotnosti je asi 60 mg (1 µl takto připraveného roztoku obsahuje asi 1,2 µg vinylchloridu).
Standardní roztok vinylchloridu. K 1 objemovému dílu základního roztoku vinylchloridu se přidají 3 objemové díly *dimethylacetamidu R.*
Porovnávací roztoky. Do šesti lahviček pro opakovaný odběr na 50 ml se přenese po 10,0 ml roztoku vnitřního standardu, lahvičky se uzavřou a zátky se zajistí. Do pěti lahviček se jednotlivě nastříkne 1 µl, 2 µl, 3 µl, 5 µl a 10 µl standardního roztoku vinylchloridu. Šest takto připravených roztoků obsahuje tedy 0 µg, asi 0,3 µg, asi 0,6 µg, asi 0,9 µg, asi 1,5 µg a asi 3 µg vinylchloridu. Lahvičky se opatrně protřepou tak, aby nedošlo ke smočení uzávěru roztokem, a temperují se 2 h ve vodní lázni při (60 ± 1) °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 3 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 5 % *dimethylstearamidu R* a 5 % *makrogolu 400 R,*
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 45 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C a teplota detektoru na 150 °C.

Provede se head space nástřik po 1 ml z každé lahvičky pro opakovaný odběr. Vypočte se obsah vinylchloridu.

Baryum. 2,0 g se žíhají v křemenném kelímku. Zbytek se převede 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a na vodní lázni odpaří do sucha. Tento zbytek se dvakrát převede vždy 1 ml *destilované vody R.* Zfiltruje se a přidají se 3 ml *síranu vápenatého RS*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený za použití 1,2 ml základního *roztoku barya (50 µg Ba/ml)*, 0,8 ml *vody destilované R* a 3 ml *síranu vápenatého RS* (30 µg/g).

Kadmium. Nejvýše 0,6 µg Cd/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 10 ml roztoku S1 se odpaří do sucha. Zbytek se převede 5 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 ml/l), zfiltruje se a filtrát se zředí stejným roztokem kyseliny na 10,0 ml.

Porovnávací roztoky. Připraví se ze základního *roztoku kadmia (1 mg Cd/ml)* zředěním roztokem *kyseliny chlorovodíkové R (10 ml/l)*.

Změří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 10 ml roztoku S1 se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, až roztok mírně zrůžoví. Zředí se *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 µg Pb/ml)*.

Cín. K 10 ml roztoku S1 se přidá 0,3 ml *kyseliny thioglykolové R* a 30 ml *vody R*. Po smíchání se přidají 2 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (10 g/l) a 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dithiolu R* (5 g/l) v *ethanolu R* a zředí se *vodou R* na 50 ml. Po 15 min není zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml roztoku *kyseliny sírové R* (200 ml/l) a 6 ml základního *roztoku cínu (5 µg Sn/ml)* (30 µg/g).

Stanovení obsahu polyvinylchloridu

K 0,500 g se přidá 30 ml *tetrahydrofuranu R* a zahřívá se 10 min za míchání na vodní lázni v digestoři. Materiál se zcela rozpustí. Za míchání se po kapkách přidá 60 ml *methanolu R*, vzniká zrnitá sraženina polyvinylchloridu. Ponechá se stát několik minut a pokračuje se v přidávání *methanolu R*, dokud se tvoří sraženina. Použitím tří malých dávek *methanolu R* se sraženina převede na filtr ze slinutého skla (40) a propláchne se. Filtr se sraženinou se vysuší do konstantní hmotnosti při 60 °C a zváží se.

3.1.3 Polyolefiny

Získávají se polymerizací ethylenu nebo propylenu nebo kopolymerizací těchto látek nejvýše s 20 % vyšších homologů (C_4 až C_{10}) nebo karboxylových kyselin nebo esterů. Určité materiály mohou být směsí polyolefinů.

Mohou obsahovat nejvýše tři stabilizátory, jedno nebo několik maziv nebo separačních činidel a také oxid titaničitý jako zneprůhledňující činidlo, pokud je třeba uchovávanou látku chránit před světlem.

Všechny tyto přísady se vybírají z připojeného seznamu, který určuje pro každý výrobek nejvyšší povolený obsah a příslušnou metodu kontroly. Seznam přísad obsažených v materiálu musí výrobce uživateli sdělit.

Tento text se vztahuje na všechny polyolefiny určené pro lékařské a farmaceutické účely s výjimkou materiálů, jejichž použití je již popsáno v textech lékopisu.

Vlastnosti

Prášek, kuličky, granule nebo fólie různé tloušťky. Jsou prakticky nerozpustné ve vodě, v ethanolu, v hexanu a v methanolu, za horka jsou dobře rozpustné v aromatických uhlovodících. Měknou při teplotách 90 °C až 150 °C. Hoří modrým plamenem s pachem po parafinu.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,25 g se přidá 10 ml *toluenu R* a vaří se asi 15 min pod zpětným chladičem. Několik kapek získaného roztoku se nanese na destičku chloridu sodného a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C. Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*). Spektrum zkoušeného materiálu vykazuje maxima zvláště při 2920 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1475 cm^{-1}, 1465 cm^{-1}, 1380 cm^{-1}, 1170 cm^{-1}, 737 cm^{-1} a 722 cm^{-1}; získané spektrum se shoduje se spektrem materiálu zvoleného podle typu zkoušeného vzorku. Jestliže je zkoušený materiál ve formě fólií, lze přímo změřit spektrum odříznutého kousku o vhodné velikosti.

B. Doplňkové zkoušky, viz Zkoušky na čistotu, odpovídající přítomným přísadám jsou zároveň zkouškami totožnosti.

C. Asi 20 mg se smíchá v platinovém kelímku s 1 g *hydrogensíranu draselného R* a zahřívá se, dokud úplně neroztaje. Po ochlazení se přidá 20 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a mírně se zahřeje. Výsledný roztok se zfiltruje a k filtrátu se přidá 1 ml *kyseliny fosforečné R* a 1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R.* Jestliže je látka zneprůhledněna oxidem titaničitým, vzniká oranžovožluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

V případě potřeby se vzorky zkoušeného materiálu nařežou na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Roztok S1. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem, přidá se 500 ml *vody R* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem. Nechá se vychladnout a sleje se. Část roztoku se ponechá pro zkoušku Vzhled roztoku S1 a zbytek se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). *Roztok S1 se použije do 4 h po přípravě.*

Roztok S2. 2,0 g se převedou do kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 80 ml *methanolu R* a vaří se 1 h 30 min pod zpětným chladičem za stálého míchání. Nechá se ochladit na 60 °C a za stálého míchání se přidá 120 ml *methanolu R*. Roztok se zfiltruje

filtrem ze slinutého skla (16). Baňka a filtr se vypláchnou 25 ml směsi objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (40 + 60), výplachy se přidají k filtrátu a zředí se stejným rozpouštědlem na 250 ml. Připraví se kontrolní roztok.

Roztok S3. 100 g se převede do kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 250 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Nechá se vychladnout a roztok se sleje.

Základní zkoušky

Vzhled roztoku S1. Roztok S1 je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného BMF RS*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS*. K dosažení počátku barevného přechodu se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S1 při 220 nm až 340 nm je nejvýše 0,2 .

Redukující látky. Ke 20 ml roztoku S1 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Vaří se pod zpětným chladičem 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku je nejvýše 2,0 ml.

Extrahovatelné těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S3 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 5,00 g. Tento limit neplatí pro materiál zneprůhledněný oxidem titaničitým.

Doplňkové zkoušky

Všechny tyto zkoušky nebo jejich část se provádějí pouze tehdy, jestliže je to opodstatněno uvedeným složením nebo použitím materiálu.

Fenolické antioxidanty. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou jsou jednotlivé následující směsi:
  - *mobilní fáze 1* při průtoku 2 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (30 + 70),
  - *mobilní fáze 2* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *tetrahydrofuranu R a acetonitrilu R* (10 + 30 + 60),
  - *mobilní fáze 3* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *2-propanolu R* a *methanolu R* (5 + 45 + 50),
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Chromatografický systém musí zajistit:

- rozlišení nejméně 8 mezi píky odpovídajícími *butylhydroxytoluenu R* a *stabilizátoru polymerů R1* s mobilní fází 1,
- rozlišení nejméně 2 mezi píky odpovídajícími *stabilizátoru polymerů R2* a *stabilizátoru polymerů R3* s mobilní fází 2,
- rozlišení nejméně 2 mezi píky odpovídajícími *stabilizátoru polymerů R4* a *stabilizátoru polymerů R9* s mobilní fází 3.

Zkoušený roztok S21. 50 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.
Zkoušený roztok S22. 50 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml *dichlormethanu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.

Z následujících porovnávacích roztoků se připraví pouze ty roztoky, které jsou potřebné pro analýzu fenolických antioxidantů uvedených ve složení zkoušené látky.

Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R2* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R9* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (e). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (f). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R5* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (g). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (h). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R2* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (i). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.
Porovnávací roztok (j). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R9* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Jestliže zkoušená látka obsahuje *butylhydroxytoluen R* nebo *stabilizátor polymerů R1*, použije se mobilní fáze 1 a nastříkne se 20 µl roztoku S21, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a) a buď 20 µl roztoku (d), nebo (e), nebo 20 µl roztoků (d) a (e).

Jestliže zkoušená látka obsahuje jeden nebo více následujících antioxidantů:
- *stabilizátor polymerů R2*,
- *stabilizátor polymerů R3,*
- *stabilizátor polymerů R4*,
- *stabilizátor polymerů R5*,
- *stabilizátor polymerů R9*,

použije se mobilní fáze 2 a nastříkne se 20 µl roztoku S21, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (b) a 20 µl každého porovnávacího roztoku antioxidantu v tomto seznamu, který je uveden ve složení zkoušené látky.

Jestliže zkoušená látka obsahuje *stabilizátor polymerů R4* nebo *stabilizátor polymerů R9* nebo oba tyto stabilizátory, použije se mobilní fáze 3 a nastříkne se 20 µl roztoku S22, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (c) a buď 20 µl porovnávacího roztoku (i), nebo (j), nebo 20 µl roztoků (i) a (j).

Ve všech případech se chromatogram zaznamenává po dobu 30 min; chromatogramy odpovídající roztokům S21 a S22 mají pouze píky antioxidantů uvedených ve složení a menší píky, které se také objevují na chromatogramech odpovídajících kontrolním roztokům. Plochy píků roztoků S21 a S22 jsou menší než odpovídající plochy píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (d) až (j).

Nefenolické antioxidanty. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok S23. 100 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *dichlormethanu okyseleném R.*

Porovnávací roztok (k). 60 mg *stabilizátoru polymerů R6* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (l). 60 mg *dioktadecyldisulfidu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (m). 60 mg *stabilizátoru polymerů R7* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (n). 60 mg *stabilizátoru polymerů R8* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (o). 60 mg *stabilizátoru polymerů R7* a 60 mg *stabilizátoru polymerů R8* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 20 µl zkoušeného roztoku S23, 20 µl porovnávacího roztoku (*o*) a po 20 µl porovnávacích roztoků odpovídajících všem fenolickým a nefenolickým antioxidantům zmíněným v typovém složení zkoušeného materiálu. Vyvíjí se *hexanem R* po dráze 18 cm. Nechá se usušit a vyvíjí se podruhé *dichlormethanem R* po dráze 17 cm. Vrstva se nechá usušit a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Postříká se *jodem v lihu RS* a po 10 min až 15 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 není intenzivnější než skvrny na odpovídajících polohách na chromatogramech porovnávacích roztoků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (o) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Amidy a stearany. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití dvou desek s vrstvou *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. Roztok S23.

Porovnávací roztok (p). 20 mg *kyseliny stearové R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.*

Porovnávací roztok (q). 40 mg *oleamidu R* se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R.*

Porovnávací roztok (r). 40 mg *erukamidu R* se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R.*

Na dvě vrstvy se nanese po 10 µl roztoku S23. Na první vrstvu se nanese 10 µl porovnávacího roztoku (p) a na druhou vrstvu se nanese po 10 µl porovnávacích roztoků (q) a (r).

První vrstva se vyvíjí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *trimethylpentanu R* (25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *dichlorfenolindofenolatu sodného R* (2 g/l) v *ethanolu R* a zahřívá se v sušárně několik minut při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví.

Skvrny odpovídající kyselině stearové na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 mají shodnou polohu (R_F asi 0,5), ale nejsou intenzivnější než skvrna se stejnou polohou na chromatogramu porovnávacího roztoku (p).

Druhá vrstva se vyvíjí *hexanem R* po dráze 13 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a znovu se vyvíjí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se nechá usušit a postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (40 g/l) v *ethanolu R*. Zahřívá se v sušárně při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 odpovídající erukamidu nebo oleamidu mají shodnou polohu (R_F asi 0,2) s odpovídajícími skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (q) a (r), ale nejsou intenzivnější.

Látky rozpustné v hexanu. 1,00 g se převede do 250ml kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 100 ml *hexanu R* a vaří se za stálého míchání 4 h pod zpětným chladičem. Ochladí se v ledové vodě a rychle se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16) (*doba filtrace musí být kratší než 5 min; v případě potřeby může být filtrace urychlena přetlakem*), teplota filtrovaného roztoku se udržuje blízko 0 °C. 20 ml filtrátu v předvážené skleněné misce se odpaří na vodní lázni. Odparek se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku je v rozmezí 10 % od hmotnosti zbytku typového vzorku a je nejvýše 5 %.

Extrahovatelný hliník. Nejvýše 1 µg Al/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 100 ml roztoku S*3* se na vodní lázni odpaří do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a tento roztok se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 10 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku hliníku (200 µg Al/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Změří se absorbance při 309,3 nm za použití hliníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene oxid dusný-acetylen.

Extrahovatelný titan. Nejvýše 1 µg Ti/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 100 ml roztoku S3 se na vodní lázni odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a tento roztok se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 10 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se ze základního *roztoku titanu (100 µg Ti/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Změří se absorbance při 364,3 nm za použití titanové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene oxid dusný-acetylen.

Extrahovatelný zinek. Nejvýše 1 µg Zn/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se ze základního *roztoku zinku (10 µg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Změří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Přísady

- *Butylhydroxytoluen R*, nejvýše 0,125 %,
- *dioktadecyldisulfid R*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R1*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R2*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R3*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R4,* nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R5*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R6*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R7*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R8*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R9*, nejvýše 0,3 %.

Celkový obsah shora uvedených antioxidačních přísad je nejvýše 0,3 %.

- Hydrotalcit, nejvýše 0,5 %,
- alkanamidy, nejvýše 0,5 %,
- alkenamidy, nejvýše 0,5 %,
- křemičitan sodno-hlinitý, nejvýše 0,5 %,
- oxid křemičitý, nejvýše 0,5 %,
- benzoan sodný, nejvýše 0,5 %,
- estery nebo soli mastných kyselin, nejvýše 0,5 %,
- fosforečnan sodný, nejvýše 0,5 %,
- parafinový olej, nejvýše 0,5 %,
- oxid zinečnatý, nejvýše 0,5 %,
- mastek, nejvýše 0,5 %,
- stearan vápenatý nebo stearan zinečnatý nebo jejich směs, nejvýše 0,5 %,
- oxid titaničitý, nejvýše 4 %.

3.1.4 Polyethylen bez přísad pro obaly parenterálních a očních přípravků

Získává se polymerací ethylenu za vysokého tlaku a přítomnosti kyslíku nebo iniciátorů vzniku volných radikálů jako katalyzátoru.

Vlastnosti

Kuličky, granule nebo průsvitné fólie různé tloušťky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný za horka v aromatických uhlovodících, prakticky nerozpustný v ethanolu, v hexanu a v methanolu. Měkne při teplotách nad 65 °C.

Relativní hustota (*2.2.5*) materiálu je 0,910 až 0,937.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,25 g se přidá 10 ml *toluenu R* a vaří se asi 15 min pod zpětným chladičem. Několik kapek roztoku se nanese na destičku chloridu sodného a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C. Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*). Spektrum vykazuje absorpční maxima při 2920 cm^{-1} až 2850 cm^{-1}, 1465 cm^{-1}, 730 cm^{-1}, 720 cm^{-1}; získané spektrum se shoduje se spektrem materiálu zvoleného podle typu vzorku. Jestliže je zkoušený materiál ve formě fólie, lze přímo změřit spektrum odříznutého kousku o vhodné velikosti.

B. Zkouška Přísady, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

V případě potřeby se materiál nařeže na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Roztok S1. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem, přidá se 500 ml *vody R* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, sleje se a část roztoku se ponechá pro zkoušku vzhledu. Zbytek se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). *Roztok S1 se použije nejdéle do 4 h od přípravy.*

Roztok S2. 2 g se převedou do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 80 ml *toluenu R* a vaří se 1 h 30 min pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se na 60 °C a za stálého míchání se přidá 120 ml *methanolu R*. Roztok se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). Baňka a filtr se promyjí 25 ml směsi 40 ml *toluenu R* a 60 ml *methanolu R,* promývací tekutina se přidá k filtrátu a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 250 ml. Připraví se kontrolní roztok.

Roztok S3. 100 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 250 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Roztok se nechá ochladit a sleje se.

Vzhled roztoku S1. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného BMF RS*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.* Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS.* K dosažení počátku barevného přechodu se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S1 při 220 nm až 350 nm je nejvýše 0,2.

Redukující látky. Ke 20 ml roztoku S1 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS.* Vaří se pod zpětným chladičem 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami titračního roztoku je nejvýše 0,5 ml.

Látky rozpustné v hexanu. 1,00 g se převede do 250ml baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 100 ml *hexanu R* a vaří se 4 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se v ledové vodě a rychle se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16), teplota roztoku se udržuje na 0 °C. (*Doba filtrace nemá překročit 5 min; pokud je třeba, zrychlí se filtrace přetlakem.*) 20 ml filtrátu v předvážené skleněné misce se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku se neliší o více než 10 % od typového vzorku a nepřevyšuje 5 %.

Přísady. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 50 ml roztoku S2 se odpaří za vakua při 45 °C do sucha. Odparek se zředí 25 ml *dichlormethanu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.

Porovnávací roztok. 20 mg *dioktadecyldisulfidu R* a 20 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 µl obou roztoků a vyvíjí se *hexanem R* po dráze 13 cm. Nechá se usušit na vzduchu a vyvíjí se podruhé směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Usuší se na vzduchu a postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (40 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá se při 120 °C do objevení skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou žádné skvrny, kromě

skvrny, která může být na čele rozpouštědla z prvního vyvíjení a která odpovídá oligomerům. Nepřihlíží se ke skvrnám odpovídajícím skvrnám na chromatogramu kontrolního roztoku. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Extrahovatelné těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S3 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2,5 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 5,0 g zkoušeného materiálu.

3.1.5 Polyethylen s přísadami pro obaly parenterálních a očních přípravků

Získává se polymerizací ethylenu za tlaku v přítomnosti katalyzátoru nebo kopolymerizací ethylenu s nejvýše 20 % vyšších alkenových homologů (C_3 až C_5).

Vlastnosti

Prášek, kuličky, granule nebo průsvitné fólie různé tloušťky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu, v hexanu a v methanolu, dobře rozpustný v horkých aromatických uhlovodících. Měkne při teplotách mezi 70 °C až 140 °C.

Relativní hustota materiálu (*2.2.5*) je 0,890 až 0,965.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,25 g se přidá 10 ml *toluenu R* a vaří se asi 15 min pod zpětným chladičem. Několik kapek roztoku se nanese na destičku chloridu sodného a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C. Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*). Spektrum vykazuje absorpční maxima při 2920 cm^{-1} až 2850 cm^{-1}, 1465 cm^{-1}, 1375 cm^{-1}, 1170 cm^{-1} 730 cm^{-1}, 720 cm^{-1}; získané spektrum je shodné se spektrem materiálu zvoleného podle typu vzorku. Jestliže je zkoušený materiál ve formě fólie, lze přímo změřit spektrum odříznutého kousku o vhodné velikosti.

B. Doplňkové zkoušky odpovídající přítomným přísadám, viz Zkoušky na čistotu, jsou zároveň zkouškami totožnosti.

Zkoušky na čistotu

V případě potřeby se materiál nařeže na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Roztok S1. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem, přidá se 500 ml *vody R* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, sleje se a část roztoku se ponechá pro zkoušku vzhledu. Zbytek se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). *Roztok S1 se použije nejdéle do 4 h od přípravy.*

Roztok S2. 2,0 g se převedou do kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 80 ml *toluenu R* a vaří se 1 h 30 min pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se na 60 °C a za stálého míchání se přidá 120 ml *methanolu R*. Roztok se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). Baňka a filtr se promyjí 25 ml směsi 40 ml *toluenu R* a 60 ml *methanolu R,* promývací tekutina se přidá k filtrátu a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 250,0 ml. Připraví se kontrolní roztok.

Roztok S3. 100 g se převede do kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 250 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Roztok se nechá ochladit a sleje se.

Vzhled roztoku. Roztok S1 je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného MBF RS*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS*. K dosažení počátku barevného přechodu se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S1 při 220 nm až 350 nm je nejvýše 0,2.

Redukující látky. Ke 20 ml roztoku S1 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Vaří se pod zpětným chladičem 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku při titraci a slepé zkoušce je nejvýše 0,5 ml.

Látky rozpustné v hexanu. 1,00 g se převede do 250ml kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 100 ml *hexanu R* a vaří se 4 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se v ledové vodě a rychle se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16), teplota roztoku se udržuje na 0 °C. (*Doba filtrace nemá překročit 5 min; pokud je třeba, zrychlí se filtrace přetlakem.*) 20 ml filtrátu v předvážené skleněné misce se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku se neliší o více než 10 % od typového vzorku a je nejvýše 5 %.

Extrahovatelný hliník. Nejvýše 1 µg Al/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku hliníku (200 µg Al/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS*.

Měří se emisní intenzita při 396,15 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 396,25 nm. Ověří se nepřítomnost hliníku v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelný chrom. Nejvýše 0,05 µg Cr/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku chromu (100 µg Cr/ml)* zředěním směsí objemů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (2 + 8).

Měří se emisní intenzita při 205,55 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 205,50 nm. Ověří se nepřítomnost chromu v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelné těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S3 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2,5 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Extrahovatelný titan. Nejvýše 0,05 µg Ti/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku titanu (100 µg Ti/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS*.

Měří se emisní intenzita při 336,12 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 336,16 nm. Ověří se nepřítomnost titanu v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelný vanad. Nejvýše 10 µg V/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku vanadu (1 mg V/ml)* zředěním směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (2 + 8).

Měří se emisní intenzita při 292,40 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 292,35 nm. Ověří se nepřítomnost vanadu v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelný zinek. Nejvýše 1 µg Zn/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku zinku (10 µg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Změří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Extrahovatelné zirkonium. Nejvýše 100 µg Zr/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku zirkonia (1 µg Zr/ml)* zředěním směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (2 + 8).

Měří se emisní intenzita při 343,82 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 343,92 nm. Ověří se nepřítomnost zirkonia v použité kyselině chlorovodíkové.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky. Tento limit se nevztahuje na zkoušený materiál, u něhož byl použit oxid titaničitý k zneprůhlednění materiálu.

Doplňkové zkoušky

Všechny tyto zkoušky nebo jejich část se provádějí pouze tehdy, jestliže je to opodstatněno uvedeným složením zkoušeného materiálu.

Fenolické antioxidanty. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou jsou jednotlivé následující směsi:
  - *mobilní fáze 1* při průtoku 2 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (30 + 70),
  - *mobilní fáze 2* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *tetrahydrofuranu R a acetonitrilu R* (10 + 30 + 60),
  - *mobilní fáze 3* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *2-propanolu R* a *methanolu R* (5 + 45 + 50),
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Chromatografický systém musí zajistit:
- rozlišení nejméně 8 mezi píky odpovídajícími *butylhydroxytoluenu R* a *stabilizátoru polymerů R1* s mobilní fází 1,
- rozlišení nejméně 2 mezi píky odpovídajícími *stabilizátoru polymerů R2* a *stabilizátoru polymerů R3* s mobilní fází 2,
- rozlišení nejméně 2 mezi píky odpovídajícími *stabilizátoru polymerů R4* a *stabilizátoru polymerů R9* s mobilní fází 3.

Zkoušený roztok S21. 50,0 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.
Zkoušený roztok S22. 50,0 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 5,0 ml *dichlormethanu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.

Z následujících porovnávacích roztoků se připraví pouze ty roztoky, které jsou potřebné pro analýzu fenolických antioxidantů uvedených ve složení zkoušené látky.

Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R2* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R9* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (f). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R5* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (g). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (h). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R2* se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (i). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (j). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R9* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Jestliže zkoušená látka obsahuje *butylhydroxytoluen R* nebo *stabilizátor polymerů R1*, použije se mobilní fáze 1 a nastříkne se 20 µl roztoku S21, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a) a buď 20 µl roztoku (d), nebo (e), nebo 20 µl roztoků (d) a (e).

Jestliže zkoušená látka obsahuje jeden nebo více následujících antioxidantů:
- *stabilizátor polymerů R2*,
- *stabilizátor polymerů R3,*
- *stabilizátor polymerů R4*,
- *stabilizátor polymerů R5*,
- *stabilizátor polymerů R9*,

použije se mobilní fáze 2 a nastříkne se 20 µl roztoku S21, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (b) a 20 µl každého porovnávacího roztoku antioxidantu v tomto seznamu, který je uveden ve složení zkoušené látky.

Jestliže zkoušená látka obsahuje *stabilizátor polymerů R4* nebo *stabilizátor polymerů R9* nebo oba tyto stabilizátory, použije se mobilní fáze 3 a nastříkne se 20 µl roztoku S22, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (c) a buď 20 µl porovnávacího roztoku (i), nebo (j), nebo 20 µl roztoků (i) a (j).

Ve všech případech se chromatogram zaznamenává po dobu 30 min; chromatogramy odpovídající roztokům S21 a S22 mají pouze píky antioxidantů uvedených ve složení a menší píky, které se také objevují na chromatogramech odpovídajících kontrolním roztokům. Plochy píků roztoků S21 a S22 jsou menší než odpovídající plochy píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (d) až (j).

Nefenolické antioxidanty. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok S23. 100 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *dichlormethanu okyseleném R.*

Porovnávací roztok (k). 60 mg *stabilizátoru polymerů R6* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (l). 60 mg *dioktadecyldisulfidu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (m). 60 mg *stabilizátoru polymerů R7* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (n). 60 mg *stabilizátoru polymerů R8* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (o). 60 mg *stabilizátoru polymerů R7* a 60 mg *stabilizátoru polymerů R8* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* 2 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 20 µl zkoušeného roztoku S23, 20 µl porovnávacího roztoku (o) a po 20 µl porovnávacích roztoků odpovídajících všem fenolickým a nefenolickým antioxidantům zmíněným v typovém složení zkoušeného materiálu. Vyvíjí se *hexanem R* po dráze 18 cm. Nechá se uschnout a vyvíjí se podruhé *dichlormethanem R* po dráze 17 cm. Vrstva se nechá usušit a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Postříká se *jodem v lihu RS* a po 10 min až 15 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 není intenzivnější než skvrny na odpovídajících polohách na chromatogramech porovnávacích roztoků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (o) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Amidy a stearany. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití dvou desek s vrstvou *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. Roztok S23.

Porovnávací roztok (p). 20 mg *kyseliny stearové R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.*

Porovnávací roztok (q). 40 mg *oleamidu R* se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R.*

Porovnávací roztok (r). 40 mg *erukamidu R* se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R.*

Na dvě vrstvy se nanese po 10 µl roztoku S23. Na první vrstvu se nanese 10 µl porovnávacího roztoku (p) a na druhou vrstvu se nanese po 10 µl porovnávacích roztoků (q) a (r).

První vrstva se vyvíjí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *trimethylpentanu R* (25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *dichlorfenolindofenolatu sodného R* (2 g/l) v *ethanolu R* a zahřívá se v sušárně několik minut při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví.

Skvrny odpovídající kyselině stearové na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 mají shodnou polohu (R_F asi 0,5), ale nejsou intenzivnější než skvrna se stejnou polohou na chromatogramu porovnávacího roztoku (p).

Druhá vrstva se vyvíjí *hexanem R* po dráze 13 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a znovu se vyvíjí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se nechá usušit a postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (40 g/l) v *ethanolu R*. Zahřívá se v sušárně při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 odpovídající erukamidu nebo oleamidu mají shodnou polohu (R_F asi 0,2) s odpovídajícími skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (q) a (r), ale nejsou intenzivnější.

Přísady

- *Butylhydroxytoluen R*, nejvýše 0,125 %,
- *dioktadecyldisulfid R*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R1*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R2*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R3*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R4,* nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R5*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R6*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R7*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R8*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R9*, nejvýše 0,3 %.

Celkový obsah shora uvedených antioxidačních přísad je nejvýše 0,3 %.

- Hydrotalcit, nejvýše 0,5 %,
- alkanamidy, nejvýše 0,5 %,
- alkenamidy, nejvýše 0,5 %,
- křemičitan sodno-hlinitý, nejvýše 0,5 %,
- oxid křemičitý, nejvýše 0,5 %,
- benzoan sodný, nejvýše 0,5 %,
- estery nebo soli mastných kyselin, nejvýše 0,5 %,
- fosforečnan sodný, nejvýše 0,5 %,
- parafinový olej, nejvýše 0,5 %,
- oxid zinečnatý, nejvýše 0,5 %,
- mastek, nejvýše 0,5 %,
- stearan vápenatý nebo stearan zinečnatý nebo jejich směs, nejvýše 0,5 %,
- oxid titaničitý, nejvýše 4 %.

3.1.6 Polypropylen pro obaly a uzávěry parenterálních a očních přípravků

Je to homopolymer propylenu nebo kopolymer propylenu s nejvýše 20 % ethylenu nebo směs polypropylenu s nejvýše 20 % polyethylenu. Může obsahovat přísady.

Vlastnosti

Prášek, kuličky, granule nebo průsvitné fólie různé tloušťky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu, v hexanu a v methanolu, dobře rozpustný v horkých uhlovodících. Měkne při teplotách nad 120 °C.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,25 g se přidá 10 ml *toluenu R* a vaří se asi 15 min pod zpětným chladičem. Několik kapek horkého roztoku se nanese na destičku chloridu sodného a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C. Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*). Spektrum vykazuje absorpční maxima při 1375 cm^{-1}, 1170 cm^{-1} 995 cm^{-1}, 970 cm^{-1}; získané spektrum se shoduje se spektrem materiálu zvoleného podle typu vzorku. Jestliže je zkoušený materiál ve formě fólie, lze přímo změřit spektrum odříznutého kousku o vhodné velikosti.

B. Doplňkové zkoušky odpovídající přítomným přísadám, viz Zkoušky na čistotu, jsou zároveň zkouškami totožnosti.

Zkoušky na čistotu

V případě potřeby se materiál nařeže na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Roztok S1. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem, přidá se 500 ml *vody R* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, sleje se a část roztoku se ponechá pro zkoušku vzhledu. Zbytek se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). *Roztok S1 se použije nejdéle do 4 h od přípravy.*

Roztok S2. 2,0 g se převedou do kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 80 ml *toluenu R* a vaří se 1 h 30 min pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se na 60 °C a za stálého míchání se přidá 120 ml *methanolu R.* Roztok se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). Baňka a filtr se promyjí 25 ml směsi 40 ml *toluenu R* a 60 ml *methanolu R,* promývací tekutina se přidá k filtrátu a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 250,0 ml. Připraví se kontrolní roztok.

Roztok S3. 100 g se převede do kuželové baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 250 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Roztok se nechá ochladit a sleje se.

Vzhled roztoku. Roztok S1 neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného BMF RS.* Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.* Ke 100 ml roztoku S1 se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS.* K dosažení počátku barevného přechodu se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S1 při 220 nm až 350 nm je nejvýše 0,2.

Redukující látky. Ke 20 ml roztoku S1 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS.* Vaří se pod zpětným chladičem 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku je nejvýše 0,5 ml.

Látky rozpustné v hexanu. 1,00 g se převede do 250ml kuželové borokřemičité baňky se zabroušeným hrdlem. Přidá se 100 ml *hexanu R* a vaří se 4 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se v ledové vodě a rychle se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16), teplota roztoku se udržuje na 0 °C. (*Doba filtrace nemá překročit 5 min; pokud je třeba, zrychlí se filtrace přetlakem.*) 20 ml filtrátu v předvážené skleněné misce se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku se neliší o více než 10 % od typového vzorku a je nejvýše 5 %.

Extrahovatelný hliník. Nejvýše 1 µg Al/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku hliníku (200 µg Al/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Měří se emisní intenzita při 396,15 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 396,25 nm. Ověří se nepřítomnost hliníku v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelný chrom. Nejvýše 0,05 µg Cr/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku chromu (100 µg Cr/ml)* zředěním směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (2 + 8).

Měří se emisní intenzita při 205,55 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 205,50 nm. Ověří se nepřítomnost chromu v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelné těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S3 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2,5 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml).*

Extrahovatelný titan. Nejvýše 0,05 µg Ti/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku titanu (100 µg Ti/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Měří se emisní intenzita při 336,12 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 336,16 nm. Ověří se nepřítomnost titanu v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelný vanad. Nejvýše 10 µg V/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií v argonové plazmě (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku vanadu (1 mg V/ml)* zředěním směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (2 + 8).

Měří se emisní intenzita při 292,40 nm; použije se hodnota spektrálního pozadí při 292,35 nm. Ověří se nepřítomnost vanadu v použité kyselině chlorovodíkové.

Extrahovatelný zinek. Nejvýše 1 µg Zn/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S3.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku zinku (10 µg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS.*

Změří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky. Tento limit se nevztahuje na zkoušený materiál, u něhož byl použit oxid titaničitý k zneprůhlednění materiálu.

Doplňkové zkoušky

Všechny tyto zkoušky nebo jejich část se provádějí pouze tehdy, jestliže je to opodstatněno uvedeným složením zkoušeného materiálu.

Fenolické antioxidanty. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou jsou jednotlivé následující směsi:
  - *mobilní fáze 1* při průtoku 2 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (30 + 70),
  - *mobilní fáze 2* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *tetrahydrofuranu R a acetonitrilu R* (10 + 30 + 60),
  - *mobilní fáze 3* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *2-propanolu R* a *methanolu R* (5 + 45 + 50),
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Chromatografický systém musí zajistit:

- rozlišení nejméně 8 mezi píky odpovídajícími *butylhydroxytoluenu R* a *stabilizátoru polymerů R1* s mobilní fází 1,
- rozlišení nejméně 2 mezi píky odpovídajícími *stabilizátoru polymerů R2* a *stabilizátoru polymerů R3* s mobilní fází 2,
- rozlišení nejméně 2 mezi píky odpovídajícími *stabilizátoru polymerů R4* a *stabilizátoru polymerů R9* s mobilní fází 3.

Zkoušený roztok S21. 50,0 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.

Zkoušený roztok S22. 50,0 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 5,0 ml *dichlormethanu R*. Připraví se kontrolní roztok z kontrolního roztoku odpovídajícího roztoku S2.

Z následujících porovnávacích roztoků se připraví pouze ty roztoky, které jsou potřebné pro analýzu fenolických antioxidantů uvedených ve složení zkoušené látky.

Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R2* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R9* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (e). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R1* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (f). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R5* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (g). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R.* 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (h). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R2* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R.* 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (i). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (j). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R9* rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Jestliže zkoušená látka obsahuje *butylhydroxytoluen R* nebo *stabilizátor polymerů R1*, použije se mobilní fáze 1 a nastříkne se 20 µl roztoku S21, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a) a buď 20 µl roztoku (d), nebo (e), nebo 20 µl roztoků (d) a (e).

Jestliže zkoušená látka obsahuje jeden nebo více následujících antioxidantů:
- *stabilizátor polymerů R2*,
- *stabilizátor polymerů R3,*
- *stabilizátor polymerů R4*,
- *stabilizátor polymerů R5*,
- *stabilizátor polymerů R9*,

použije se mobilní fáze 2 a nastříkne se 20 µl roztoku S21, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (b) a 20 µl každého porovnávacího roztoku antioxidantu v tomto seznamu, který je uveden ve složení zkoušené látky.

Jestliže zkoušená látka obsahuje *stabilizátor polymerů R4* nebo *stabilizátor polymerů R9* nebo oba tyto stabilizátory, použije se mobilní fáze 3 a nastříkne se 20 µl roztoku S22, 20 µl odpovídajícího kontrolního roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (c) a buď 20 µl porovnávacího roztoku (i), nebo (j), nebo 20 µl roztoků (i) a (j).

Ve všech případech se chromatogram zaznamenává po dobu 30 min; na chromatogramech odpovídajících roztokům S21 a S22 jsou pouze píky antioxidantů uvedených ve složení a menší píky, které se také objevují na chromatogramech odpovídajících kontrolním roztokům. Plochy píků roztoků S21 a S22 jsou menší než odpovídající plochy píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (d) až (j).

Nefenolické antioxidanty. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok S23. 100,0 ml roztoku S2 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Odparek se rozpustí ve 2,0 ml *dichlormethanu okyseleném R.*
Porovnávací roztok (k). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R6* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (l). 60,0 mg *dioktadecyldisulfidu R* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (m). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R7* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (n). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R8* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (o). 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R7* a 60,0 mg *stabilizátoru polymerů R8* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R.* 2,0 ml roztoku se zředí *dichlormethanem okyseleným R* na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 20 µl zkoušeného roztoku S23, 20 µl porovnávacího roztoku (o) a po 20 µl porovnávacích roztoků odpovídajících všem fenolickým a nefenolickým antioxidantům zmíněným v typovém složení zkoušeného materiálu. Vyvíjí se *hexanem R* po dráze 18 cm. Nechá se usušit a vyvíjí se podruhé *dichlormethanem R* po dráze 17 cm. Vrstva se nechá usušit a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Postříká se *jodem v lihu RS* a po 10 min až 15 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 není intenzivnější než skvrny na odpovídajících polohách na chromatogramech porovnávacích roztoků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (o) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Amidy a stearany. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití dvou desek s vrstvou *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. Roztok S23.
Porovnávací roztok (p). 20 mg *kyseliny stearové R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*.
Porovnávací roztok (q). 40 mg *oleamidu R* se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R*.
Porovnávací roztok (r). 40 mg *erukamidu R* se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R*.

Na dvě vrstvy se nanese po 10 µl roztoku S23. Na první vrstvu se nanese 10 µl porovnávacího roztoku (p) a na druhou vrstvu se nanese po 10 µl porovnávacích roztoků (q) a (r).

První vrstva se vyvíjí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *trimethylpentanu R* (25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *dichlorfenolindofenolatu sodného R* (2 g/l) v *ethanolu R* a zahřívá se v sušárně několik minut při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví. Skvrny odpovídající kyselině stearové na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 mají shodnou polohu (R_F asi 0,5), ale nejsou intenzivnější než skvrna se stejnou polohou na chromatogramu porovnávacího roztoku (p).

Druhá vrstva se vyvíjí *hexanem R* po dráze 13 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a znovu se vyvíjí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se nechá usušit a postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (40 g/l) v *ethanolu R*. Zahřívá se v sušárně při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku S23 odpovídající erukamidu nebo oleamidu mají shodnou polohu (R_F asi 0,2) s odpovídajícími skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (q) a (r), ale nejsou intenzivnější.

Přísady

- *Butylhydroxytoluen R*, nejvýše 0,125 %,
- *dioktadecyldisulfid R*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R1*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R2*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R3*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R4,* nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R5*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R6*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R7*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R8*, nejvýše 0,3 %,
- *stabilizátor polymerů R9*, nejvýše 0,3 %.

Celkový obsah shora uvedených antioxidačních přísad je nejvýše 0,3 %.

- Hydrotalcit, nejvýše 0,5 %,
- alkanamidy, nejvýše 0,5 %,

- alkenamidy, nejvýše 0,5 %,
- křemičitan sodno-hlinitý, nejvýše 0,5 %,
- oxid křemičitý, nejvýše 0,5 %,
- benzoan sodný, nejvýše 0,5 %,
- estery nebo soli mastných kyselin, nejvýše 0,5 %,
- fosforečnan sodný, nejvýše 0,5 %,
- parafinový olej, nejvýše 0,5 %,
- oxid zinečnatý, nejvýše 0,5 %,
- mastek, nejvýše 0,5 %,
- stearan vápenatý nebo stearan zinečnatý nebo jejich směs, nejvýše 0,5 %,
- oxid titaničitý, nejvýše 4 %.

3.1.7 Kopolymer ethylen-vinylacetat pro obaly a hadičky přípravků parenterální výživy

Kopolymer ethylen-vinylacetat, který vyhovuje následujícím požadavkům, je vhodný pro výrobu hadiček a obalů přípravků parenterální výživy.

Vyrábí se kopolymerací směsí ethylenu a vinylacetatu. Materiály na obaly obsahují nejvýše 25 % vinylacetatu v kopolymeru, materiály na hadičky obsahují nejvýše 30 % vinylacetatu. Mohou obsahovat nejvýše tři z těchto stabilizátorů:
- nejvýše 0,125 % *butylhydroxytoluenu R*,
- nejvýše 0,2 %:
  - *stabilizátoru polymerů R2*,
  - *stabilizátoru polymerů R3*,
  - *stabilizátoru polymerů R4*,
  - *stabilizátoru polymerů R9*.

  Může obsahovat:
- nejvýše 0,2 % oleamidu nebo erukamidu,
- nejvýše 0,5 % stearanu vápenatého nebo stearanu zinečnatého nebo nejvýše 0,5 % jejich směsi,
- nejvýše 0,5 % uhličitanu vápenatého nebo nejvýše 0,5 % hydroxidu draselného,
- nejvýše 0,2 % oxidu křemičitého.

Vlastnosti

Kuličky, granule, průsvitné fólie nebo hadice různé tloušťky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu a v hexanu, který rozpouští nízkomolekulární polymery, je dobře rozpustný v horkých aromatických uhlovodících. Hoří modrým plamenem s pachem po parafinu a nevýrazným pachem po kyselině octové. Teplota, při které látka zvolna měkne, se mění s obsahem vinylacetatu; klesá z asi 100 °C při obsahu několika procent vinylacetatu až k 70 °C při obsahu 30 % vinylacetatu.

Zkoušky totožnosti

K 0,25 g se přidá 10 ml *toluenu R* a vaří se asi 15 min pod zpětným chladičem. Několik kapek roztoku se nanese na destičku chloridu sodného a rozpouštědlo se odpaří v sušárně při 80 °C. Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*). Spektrum zkoušené látky vykazuje absorpční maxima odpovídající monomerní jednotce vinylacetu při 1740 cm^{-1} , 1374 cm^{-1}, 1240 cm^{-1}, 1020 cm^{-1} a 610 cm^{-1} a absorpční maxima odpovídající ethylenu při 2920 cm^{-1} až 2850 cm^{-1},

1470 cm^{-1}, 1460 cm^{-1}, 1374 cm^{-1}, 730 cm^{-1} a 720 cm^{-1}. Získané spektrum se shoduje se spektrem referenční látky poskytnuté výrobcem. Jestliže je zkoušený materiál ve formě fólie, lze změřit spektrum odříznutého kousku o vhodné velikosti.

Zkoušky na čistotu

V případě potřeby se vzorky zkoušeného materiálu nařežou na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Roztok S1. 2,0 g se převedou do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 80 ml *toluenu R* a zahřívá se 1,5 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se na 60 °C a za stálého míchání se do baňky přidá 120 ml *methanolu R*. Roztok se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). Baňka a filtr se promyjí 25 ml směsi objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (40 + 60). Promývací tekutina se přidá k filtrátu a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 250 ml.

Roztok S2. 25 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem, přidá se 500 ml *vody R* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem. Nechá se vychladnout a sleje se. Část roztoku se uchová pro zkoušku Vzhled roztoku a zbytek se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). *Roztok se musí použít do 4 h od přípravy.*

Vzhled roztoku. Roztok S2 je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S2 se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného BMF RS*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. Ke 100 ml roztoku S2 se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS*. K dosažení počátku barevného přechodu (ze žluté na oranžové zbarvení) se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S2 při 220 nm až 340 nm je nejvýše 0,2.

Redukující látky. Ke 20 ml roztoku S2 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Vaří se pod zpětným chladičem 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška; rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku je nejvýše 2,0 ml.

Amidy a kyselina stearová. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití dvou desek s vrstvou *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 100 ml roztoku S1 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *dichlormethanu okyseleného R*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *kyseliny stearové R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*.
Porovnávací roztok (b). 40 mg *oleamidu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 1 ml roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (c). 40 mg *erukamidu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*. 1 ml roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 5 ml.

Na dvě vrstvy se nanese po 10 µl roztoku každého roztoku. První vrstva se vyvíjí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *trimethylpentanu R* (25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *dichlorofenolindofenolatu sodného R* (2 g/l) v *ethanolu R* a zahřívá se v sušárně několik minut při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající kyselině stearové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (*a*).

Druhá vrstva se vyvíjí *hexanem R* po dráze 13 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a znovu se vyvíjí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se nechá usušit a postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (40 g/l) v *ethanolu R*. Zahřívá se v sušárně při 120 °C, dokud se skvrny nevybarví. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídající erukamidu nebo oleamidu nejsou intenzivnější než skvrny na chromatogramech porovnávacích roztoků (b) a (c), ale nejsou intenzivnější.

Fenolické antioxidanty. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 ml roztoku S1 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*.

Zkoušený roztok (b). 50,0 ml roztoku S1 se odpaří ve vakuu při 45 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml *dichlormethanu R*.

Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *butylhydroxytoluenu R*, 40,0 mg *stabilizátoru polymerů R2*, 40,0 mg *stabilizátoru polymerů R3* a 40,0 mg *stabilizátoru polymerů R4* se rozpustí v 10,0 ml směsi stejných objemů *acetonitrilu R* a *tetrahydrofuranu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 40 mg *stabilizátoru polymerů R4* a 40 mg *stabilizátoru polymerů R9* se rozpustí v 10,0 ml *dichlormethanu R*. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou jsou jednotlivé následující směsi:
  - *mobilní fáze 1* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *tetrahydrofuranu R a acetonitrilu R* (10 + 30 + 60),
  - *mobilní fáze 2* při průtoku 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R*, *2-propanolu R* a *methanolu R* (5 + 45 + 50),
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Při použití mobilní fáze 1 se nastříkne 20 µl zkoušeného roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (a).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) jsou pouze základní píky odpovídající píkům na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) s retenčním časem delším než 2 min.

Plochy píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nejsou větší než plochy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a), kromě posledního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže s mobilní fází 1 počet teoretických pater vypočtených pro pík odpovídající butylhydroxytoluenu je nejméně 2500 a rozlišení mezi píky *stabilizátoru polymerů R3* a *stabilizátoru polymerů R2* není menší než 2,0.

Jestliže je na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) pík se stejným retenčním časem, jako má pík posledního antioxidantu z porovnávacího roztoku (a), použije se mobilní fáze 2 takto:

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku (b) a 20 µl porovnávacího roztoku (b).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) jsou pouze hlavní píky s retenčním časem delším než 3 min odpovídající píkům na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Plochy píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) nejsou větší než plochy, které odpovídají píkům na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky *stabilizátoru polymerů R4* a *stabilizátoru polymerů R2* je nejméně 2,0.

Látky rozpustné v hexanu. 5 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 50 ml *hexanu R* a vaří se 4 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Ochladí se v ledové vodě; může se vytvořit gel. Filtruje se pod přetlakem 27 kPa filtrem ze slinutého skla (16) za chlazení ledovou vodou. (*Filtr je nutno předem dokonale ochladit, doba filtrace nesmí překročit 5 min, zbytek na filtru se nepromývá.*) 20 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha. Odparek se suší 1 h při 100 °C. Hmotnost zbytku není větší než 40 mg (2 %) pro kopolymer, který je používán na obaly, a není větší než 0,1 g (5 %) pro kopolymer, který je používán na hadičky.

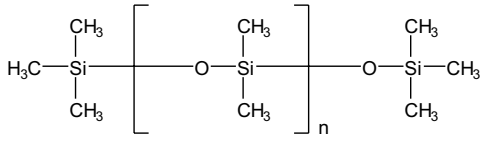
Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,2 %; stanoví se s 5,0 g zkoušeného látky.

Stanovení obsahu vinylacetatu

0,250 g až 1,000 g, podle obsahu vinylacetatu ve zkoušeném kopolymeru, se převede do 300ml kuželové baňky se zabroušeným hrdlem a magnetickým míchadlem. Přidá se 40 ml *xylenu R* a vaří se 4 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Za míchání se nechá chladnout, a když začne vypadávat tuhá fáze, pomalu se přidává 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu RS1*. Vaří se znovu 3 h pod zpětným chladičem za stálého míchání. Za míchání se nechá zchladnout, chladič se propláchne 50 ml *vody R* a do baňky se přidá 30,0 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS*. Obsah baňky se přenese do 400ml kádinky a baňka se promyje dvakrát 50 ml roztoku *síranu sodného bezvodého R* (200 g/l) a třikrát 20 ml *vody R*. Promývací tekutiny se přidají do kádinky s původním roztokem. Nadbytek kyseliny sírové se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS* odpovídá 8,609 mg vinylacetatu.

3.1.8 Silikonový olej používaný jako mazivo



Je to polydimethylsiloxan získaný hydrolýzou a polykondenzací dichlordimethylsilanu a chlortrimethylsilanu. Různé druhy jsou rozlišeny číslem umístěným za názvem, které udává jmenovitou viskozitu.

V závislosti na polymeračním stupni (n = 400 až 1200) se mění hodnota kinematické viskozity od 1000 $mm^2.s^{-1}$ do 30 000 $mm^2.s^{-1}$.

Vlastnosti

Čiré bezbarvé různě viskózní kapaliny. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v methanolu, je mísitelný s chloridem uhličitým, s chloroformem, s etherem, s ethylacetatem, s 2-butanonem, s toluenem a velmi těžce rozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *silikonového oleje CRL*. Nevyžaduje se shodnost v oblasti spektra 850 cm^{-1} až 750 cm^{-1}, protože se zde mohou projevit malé rozdíly závisející na stupni polymerizace.

C. Asi 0,5 g se ve zkumavce zahřívá nad malým plamenem do vzniku bílého dýmu. Zkumavka se nakloní nad druhou zkumavku obsahující 1 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (1 g/l) v *kyselině sírové R* tak, aby se dým dostal k roztoku. Druhá zkumavka se 10 s protřepává a 5 min zahřívá na vodní lázni; roztok se zbarví fialově.

D. V platinovém kelímku se připraví síranový popel (*2.4.14*) za použití 50 mg zkoušené látky. Zbytek je bílý prášek, který vyhovuje zkoušce na křemičitany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. Ke 2,0 g se přidá 25 ml směsi stejných objemových dílů *ethanolu R* a *etheru R*. Přidá se 0,2 ml *modři bromthymolové RS1* a směs se protřepe. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Viskozita (*2.2.10*). Změří se dynamická viskozita při 25 °C. Kinematická viskozita se vypočítá za použití hodnoty relativní hustoty 0,970. Hodnota kinematické viskozity je 95 % až 105 % deklarované hodnoty uvedené v označení na obalu.

Minerální oleje. 2 ml ve zkumavce se pozorují v ultrafialovém světle při 365 nm. Fluorescence není intenzivnější než fluorescence pozorovaná za stejných podmínek roztoku *chininiumsulfatu R* (0,1 mg/l) v *kyselině sírové 0,005 mol/l RS.*

Fenylované látky. Index lomu (*2.2.6*) je nejvýše 1,410.

Těkavé látky. Nejvýše 2,0 %; 2,00 g látky se suší 24 h v sušárně při 150 °C na předem zvážené misce o průměru 60 mm a hloubce 10 mm.

Těžké kovy. 1,0 g se smíchá s *chloroformem R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 20 ml. Přidá se 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *dithizonu R* (0,02 g/l) v *chloroformu R*, 0,5 ml *vody R* a 0,5 ml směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (2 g/l) (1 + 9). Současně se připraví porovnávací roztok: k 20 ml *chloroformu R* se přidá 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *dithizonu R* (0,02 g/l) v *chloroformu R,* 0,5 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)* a 0,5 ml směsi objemových dílů *amoniaku zředěného R2* a roztoku *hydroxylamoniumchloridu* (2 g/l) (1 + 9). Po smíchání se oba roztoky ihned důkladně 1 min protřepávají. Červené zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (5 µg/g).

Označování

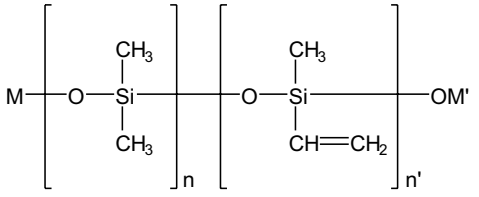
V označení na obalu se uvede za názvem výrobku číslo udávající jmenovitou viskozitu a informace, že látka se používá jako mazivo.

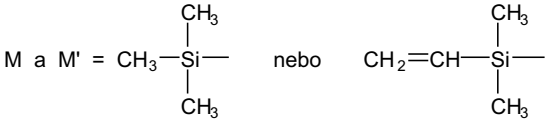
3.1.9 Silikonový elastomer pro uzávěry a hadičky

Silikonový elastomer vyhovující následujícím požadavkům je vhodný pro výrobu uzávěrů a hadiček.

Získává se příčným zesítěním lineárního polysiloxanu tvořeného zejména dimethylsiloxanovými jednotkami s malým podílem methylvinylsiloxanových skupin; konce řetězců jsou blokovány trimethylsiloxanovými nebo dimethylvinylsiloxanovými skupinami.

Obecný vzorec polysiloxanu je:





Příčné zesítění se provádí za horka:

- 2,4-dichlorbenzoylperoxidem pro vytlačované výrobky,
- 2,4-dichlorbenzoylperoxidem nebo dikumylperoxidem nebo OO-terc.butyl-O-isopropylmonoperoxidkarbonatem nebo 2,5-bis(terc.butyldioxy)-2,5-dimethylhexanem pro lité výrobky,
- nebo pomocí hydrosilylace za použití polysiloxanu se skupinami -SiH katalyzované platinou.

Vždy se používají vhodné přísady, jako oxid křemičitý, a někdy malá množství organokřemičitých přísad (α,ω-dihydroxypolydimethylsiloxan).

Vlastnosti

Průhledný nebo průsvitný materiál, bez pachu. Je prakticky nerozpustný v organických rozpouštědlech, z nichž některé, např. cyklohexan, hexan a chlorované uhlovodíky, vratně materiál bobtnají.

Zkoušky totožnosti

A. Změří se infračervené absorpční spektrum metodou mnohonásobné reflexe pro tuhé látky (*2.2.24*). Spektrum zkoušené látky se shoduje se spektrem *silikonového elastomeru CRL*.

B. 1 g se ve zkumavce zahřívá nad malým plamenem do vzniku bílého dýmu. Zkumavka se nakloní nad druhou zkumavku obsahující 1 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (1 g/l) v *kyselině sírové R* tak, aby se dým dostal k roztoku. Druhá zkumavka se 10 s protřepává a 5 min zahřívá na vodní lázni; roztok se zbarví fialově.

C. Zbytek po spálení vyhovuje zkoušce na křemičitany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

V případě potřeby se vzorky zkoušeného materiálu nařežou na kousky, jejichž největší rozměr nepřevyšuje 1 cm.

Roztok S. 25,0 g se převede do baňky z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem. Přidá se 500 ml *vody R* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a roztok se sleje.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S se přidá 0,15 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 2,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. K dalším 100 ml roztoku S se přidá 0,20 ml *oranže methylové RS*. K dosažení počátku barevného přechodu indikátoru ze žluté na oranžové se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Relativní hustota (*2.2.5*). 1,05 až 1,25; stanoví se pyknometrem s *ethanolem R* jako imerzní tekutinou.

Redukující látky. Ke 20 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Nechá se 15 min stát. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá titrace s 20 ml *vody R* místo roztoku S. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku při titraci a slepé zkoušce je nejvýše 1,0 ml.

Látky rozpustné v hexanu. Nejvýše 3,0 %; 25 ml roztoku ze zkoušky Fenylované látky se odpaří v předem zvážené skleněné odpařovací misce na vodní lázni a suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku je nejvýše 15,0 mg.

Těkavé látky. 10,0 g zkoušené látky předem 48 h uchováné v exsikátoru nad *chloridem vápenatým bezvodým R* se zahřívá 4 h v sušárně při 200 °C. Nechá se ochladit v exsikátoru a znovu se zváží. U silikonových elastomerů vyrobených za použití peroxidů je obsah těkavých látek nejvýše 0,5 %. U silikonových elastomerů vyrobených za použití platiny je obsah těkavých látek nejvýše 2,0 %.

Minerální oleje. 2,0 g se se převedou do 100ml kuželové baňky obsahující 30,0 ml směsi objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *pyridinu R* (5 + 95). Nechá se 2 h stát za častého třepání. Pyridinový roztok se sleje a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Fluorescence roztoku není intenzivnější než fluorescence roztoku *chininiumsulfatu R* (0,1 mg/l) v *kyselině sírové 0,005 mol/l RS* pozorovaná za stejných podmínek.

Fenylované látky. Ke 2,0 g v baňce z borokřemičitého skla se zabroušeným hrdlem se přidá 100 ml *hexanu R*. Vaří se 4 h pod zpětným chladičem. Ochladí se a rychle se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (16). Nádoba s filtrátem se ihned uzavře, aby se zabránilo odpařování. Absorbance měřená při 250 nm až 340 nm (*2.2.25*) je nejvýše 0,4.

Silikonové elastomery vyrobené za použití peroxidů vyhovují následující dodatečné zkoušce.

Zbytkové peroxidy. K 5,0 g v baňce z borokřemičitého skla se přidá 150 ml *dichlormethanu R*, baňka se uzavře a obsah se 16 h míchá mechanickým míchadlem. Rychle se zfiltruje do nádoby se zabroušeným hrdlem, proudem *dusíku prostého kyslíku R* se odstraní vzduch a přidá se 1,0 ml roztoku *jodidu sodného R* (200 g/l) v *kyselině octové bezvodé R*. Nádoba se uzavře, důkladně protřepe a nechá se 30 min stát chráněna před světlem. Přidá se 50 ml *vody R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku je nejvýše 2,0 ml (0,08 %, počítáno jako dichlorbenzoylperoxid).

Silikonové elastomery vyrobené za použití platiny vyhovují následující dodatečné zkoušce.

Platina. 1,0 g se spálí v křemenném kelímku za velmi pozvolného zvyšování teploty do získání bílého zbytku, který se převede do grafitového kelímku. Do křemenného kelímku se přidá 10 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů *kyseliny dusičné R* a *kyseliny chlorovodíkové R* (1 + 3), zahřívá se 1 min až 2 min na vodní lázni a převede se do grafitového kelímku. Přidá se 5 mg *chloridu draselného R* a 5 ml *kyseliny fluorovodíkové R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 5 ml *kyseliny fluorovodíkové R* a znovu se odpaří do sucha. Tento postup se opakuje ještě

dvakrát. Zbytek se na vodní lázni rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Nechá se vychladnout a roztok se přidá k 1 ml roztoku *chloridu cínatého R* (250 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Grafitový kelímek se vypláchne několika mililitry *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a stejnou kyselinou se roztok vzorku zředí na 10,0 ml. Současně se připraví porovnávací roztok: k 1 ml roztoku *chloridu cínatého R* (250 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* se přidá 1,0 ml základního *roztoku platiny (30 µg Pt/ml)* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 10 ml. Roztok vzorku se nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok (30 µg/g).

Označování

V označení na obalu se uvede, zda látka byla vyrobena za použití peroxidů, nebo platiny.

3.2 Obaly

Obal pro farmaceutické použití je výrobek určený k ochraně a uchovávání léčiv a zdravotnických prostředků, s kterými je nebo může být v přímém styku. Uzávěr je součástí obalu.

Obal, viz Obecné zásady (*1.2*), je proveden tak, aby jeho obsah mohl být odebrán způsobem vhodným pro určené použití. Zabezpečuje různý stupeň ochrany obsahu v závislosti na jeho charakteru a na vnějších podmínkách uchovávání a minimalizuje ztráty obsahu. Obal nesmí fyzikálně nebo chemicky působit na obsah tak, že by se změnila deklarovaná jakost obsahu.

Obal jednorázový. Obal pro jednorázové použití obsahuje takové množství přípravku, které je určeno pro celkové nebo částečné spotřebování při jednorázovém podání.

Obal vícedávkový. Vícedávkový obal obsahuje takové množství přípravku, které je určeno pro dvě nebo více podání.

Obal dobře uzavřený. Dobře uzavřený obal chrání obsah před znečištěním pevnými látkami a tekutinami z vnějšího prostředí a před ztrátou obsahu za podmínek obvyklých při zacházení, uchovávání a dopravě.

Obal vzduchotěsný. Vzduchotěsný obal je nepropustný pro pevné látky, kapaliny a plyny za podmínek obvyklých při zacházení, uchovávání a dopravě. Jestliže je obal určen pro opakovaný odběr, musí být proveden tak, aby se dal opakovaně vzduchotěsně uzavřít.

Obal zatavený. Zatavený obal je obal uzavřený zatavením materiálu obalu.

Obal zabezpečený. Zabezpečený obal je uzavřený obal se zařízením, které nevratně signalizuje, že obal byl otevřen.

3.2.1 Skleněné obaly pro farmaceutické použití

Jsou to skleněné výrobky určené pro přímý styk s léčivými přípravky.

Existuje několik typů skleněných obalů.

Ampule jsou obaly z tenkostěnného skla, které se po naplnění hermeticky uzavřou zatavením skla. Obsah lze vyjmout po porušení skla pouze jednorázově.

Láhve, lahvičky, stříkačky a karpule jsou silnostěnné obaly s uzávěry ze skla nebo jiných materiálů, například z plastických materiálů nebo elastomerů. Obsah lze odebírat jednorázově nebo opakovaně.

Obaly na lidskou krev a krevní složky jsou obaly válcového tvaru více nebo méně silnostěnné různého objemu z bezbarvého průhledného neutrálního skla.

Jakost skla

Bezbarvé sklo je sklo s vysokou propustností ve viditelné části spektra.

Barevné sklo je sklo získané přídavkem malých množství oxidů kovů volených podle požadované spektrální absorbance.

Neutrální sklo je borokřemičité sklo obsahující významná množství oxidu boritého, oxid hliníku nebo oxidy alkalických zemin. Vzhledem ke svému složení je neutrální sklo vysoce odolné proti teplotním změnám a vysoce odolné proti vodě.

Sodnovápenatokřemičité sklo je křemičité sklo obsahující oxidy alkalických kovů, hlavně oxid sodný, a oxidy alkalických zemin, hlavně oxid vápenatý. Vzhledem ke svému složení je sodnovápenatokřemičité sklo pouze středně odolné proti vodě.

Chemická stálost skleněných obalů pro farmaceutické použití se vyjadřuje odolností proti vodě, tj. odolností proti uvolňování rozpustných minerálních látek působením vody za předepsaných podmínek styku s vnitřním povrchem obalu nebo skleněnou drtí. Odolnost proti vodě se stanoví titrací uvolněných alkálií.

Skleněné obaly se dělí podle odolnosti proti vodě takto:

- Skleněné obaly I. třídy. Tyto obaly jsou vyrobeny z neutrálního skla a mají vysokou odolnost proti vodě danou chemickým složením skla.
- Skleněné obaly II. třídy. Tyto obaly jsou obvykle ze sodnovápenatokřemičitého skla a jejich vysoká odolnost proti vodě je výsledkem vhodné úpravy vnitřního povrchu skla.
- Skleněné obaly III. třídy. Tyto obaly jsou obvykle ze sodnovápenatokřemičitého skla a mají pouze střední odolnost proti vodě.
- Skleněné obaly IV. třídy. Tyto obaly jsou obvykle ze sodnovápenatokřemičitého skla a mají nízkou odolnost proti vodě.

Následující doporučení vytištěná kurzívou uvádějí typy skleněných obalů, které mohou být použity pro různé druhy léčivých přípravků. Za zajištění vhodného obalu pro léčivé přípravky je zodpovědný jejich výrobce.

Skleněné obaly I. třídy jsou obecně vhodné pro všechny přípravky, ať jsou nebo nejsou určeny pro parenterální použití a pro lidskou krev a krevní složky.

Skleněné obaly II. třídy jsou obecně vhodné pro kyselé a neutrální vodné přípravky k parenterálnímu použití.

Skleněné obaly III. třídy jsou vhodné pro nevodné přípravky k parenterálnímu použití, pro prášky pro parenterální použití a pro přípravky, které nejsou určeny k parenterálnímu použití.

Skleněné obaly IV. třídy jsou obecně vhodné pro tuhé přípravky, které nejsou určeny k parenterálnímu použití, a pro některé tekuté nebo polotuhé přípravky, které nejsou určeny k parenterálnímu použití.

Obecně mohou být pro určitý typ přípravku použity skleněné obaly s třídou odolnosti proti vodě vyšší, než je doporučeno.

Pro přípravky jiné než k parenterálnímu použití může být použito bezbarvé i barevné sklo. Přípravky k parenterálnímu použití se obvykle uchovávají v obalech z bezbarvého skla; pokud je známo, že přípravek je citlivý na světlo, může se použít barevné sklo. Doporučuje se, aby všechny skleněné obaly pro tekuté přípravky a pro prášky pro parenterální použití umožňovaly vizuální kontrolu obsahu.

Vnitřní povrch skleněných obalů může být speciálně upraven pro zlepšení odolnosti proti vodě, získání vodoodpudivosti apod. Vnější povrch může být také upraven, např. pro snížení tření a pro zvýšení odolnosti proti oděru. Při vnější úpravě nemá docházet ke znečištění vnitřního povrchu obalu.

S výjimkou skleněných obalů I. třídy nesmí být skleněné obaly pro léčivé přípravky používány opakovaně. Obaly pro lidskou krev a krevní složky nesmějí být použity opakovaně.

Skleněné obaly pro léčivé přípravky vyhovují příslušným zkouškám odolnosti proti vodě. Jestliže skleněné obaly mají části z jiných než skleněných materiálů, tyto zkoušky se týkají pouze skleněné části obalu.

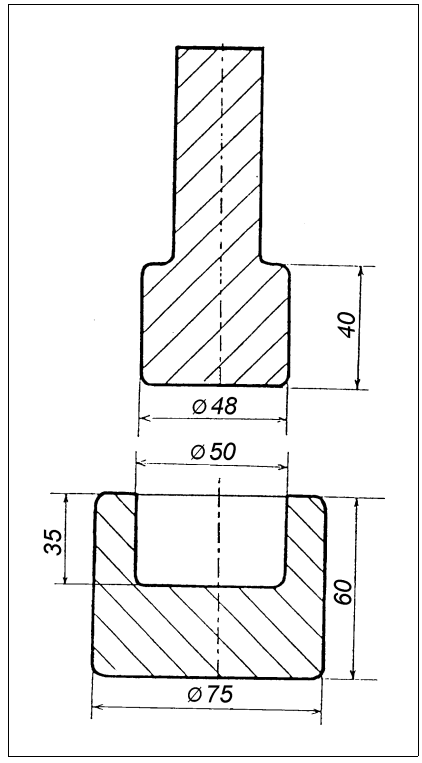
Zkoušky

Pro stanovení jakosti skleněných obalů v souladu s určeným použitím se provede jedna nebo více následujících zkoušek.

Odolnost proti vodě

Zařízení a zkoumadla:

- hmoždíř s tloučkem, viz obrázek 3.2.1-1, a kladivo z kalené magnetické oceli,
- souprava tří sít se čtvercovými oky z nerezové oceli, upevněných v rámech ze stejného materiálu:
  a) síto č. 710,
  b) síto č. 425,
  c) síto č. 250,
- stálý magnet,
- láhve a víčka z neutrálního skla, které již byly použity ke zkoušce, nebo láhve, které byly naplněny *vodou R* a zahřívány v autoklávu nejméně 1 h při 121 °C,
- fólie z inertního kovu (např. z hliníku),
- autokláv zajišťující udržení teploty (121 ± 1) °C vybavený teploměrem, tlakoměrem, odvzdušňovacím kohoutem, stojanem pro umístění vzorků a dostatečně velkým vnitřním prostorem, do něhož se umístí nad úrovní vody potřebný počet obalů k provedení zkoušky,
- horkovzdušná sušárna zajišťující udržení teploty (110 ±- 5) °C,
- váhy s rozsahem do 500 g a přesností 0,005 g,
- *voda prostá oxidu uhličitého R*,
- *červeň methylová RS*,
- *kyselina chlorovodíková 0,01 mol/l VS*,
- *aceton R*,
- směs objemových dílů *kyseliny fluorovodíkové R* a *kyseliny chlorovodíkové R* (1 + 9).



Obr. 3.2.1-1 Zařízení pro drcení skla
Rozměry v milimetrech

Objem naplnění. Je to objem vody, kterou se plní obal pro provedení zkoušky. U lahviček a láhví je objemem naplnění 90 % objemu vody potřebné pro úplné naplnění obalu po okraj. U ampulí se rozumí objem do výšky ramene.

A. Zkouška odolnosti vnitřního povrchu proti vodě.

Stanovení se provádí na nepoužitých obalech. Počet obalů pro zkoušku a objemy výluhu potřebného pro konečné stanovení jsou uvedeny v tabulce 3.2.1-1.

Tab. 3.2.1-1 Počet obalů a objem výluhu

Objem naplnění v ml	Počet obalů	Objem výluhu k titraci v ml
do 3	nejméně 10	25,0
nad 3 až 30	nejméně 10	50,0
nad 30	nejméně 10	100,0

Postup. Těsně před zkouškou se vypláchnou všechny obaly pečlivě nejméně třikrát *vodou R*, nechají se odkapat a naplní se *vodou R* na objem naplnění. Lahvičky a láhve se přikryjí miskami z neutrálního skla nebo hliníkovou fólií předem opláchnutými *vodou R*. Ampule se zataví. Obaly

se umístí do stojanu na vzorky a stojan se vloží do autoklávu obsahujícího takové množství *vody R*, aby zkoušené obaly byly nad hladinou. Autokláv se uzavře a provedou se tyto kroky:
- autokláv se vyhřeje na 100 C a otevřeným odvzdušňovacím kohoutem se 10 min nechá unikat pára,
- teplota se během 20 min zvýší ze 100 C na 121 C,
- teplota se udržuje 60 min na (121 ± 1) C,
- teplota se sníží během 40 min ze 121 C na 100 C při otevřeném odvzdušňovacím kohoutu, aby se nevytvořil podtlak.

Obaly se při dodržení obvyklé opatrnosti vyjmou z autoklávu a ochladí se pod tekoucí vodou. Titrace se provede nejpozději do 1 h po vyjmutí obalů z autoklávu. Výluhy z obalů se spojí, promíchají se a do kuželové baňky se přenese předepsaný objem tekutiny, viz tabulka 3.2.1-1. Do druhé kuželové baňky se přenese stejný objemem *vody R* (kontrolní roztok) a do obou baněk se na každých 25 ml tekutiny přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Kontrolní roztok se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l VS* a zkoušený výluh se titruje stejnou kyselinou do stejného zabarvení indikátoru jako kontrolní roztok. Spotřeba zjištěná při titraci kontrolního roztoku se odečte od spotřeby zjištěné při titraci zkoušeného výluhu a výsledná spotřeba se vyjádří v mililitrech *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* na 100 ml.

Hodnocení. Výsledky nejsou vyšší než hodnoty uvedené v tabulce 3.2.1-2.

Tab. 3.2.1-2 Limitní hodnoty zkoušky odolnosti vnitřního povrchu skleněných obalů proti vodě

Objem naplnění v ml	Spotřeba *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* na 100 ml výluhu v ml	
	skleněné obaly	
	třída I a II	třída III
do 1	2,0	20,0
nad 1 do 2	1,8	17,6
nad 2 do 5	1,3	13,2
nad 5 do 10	1,0	10,2
nad 10 do 20	0,80	8,1
nad 20 do 50	0,60	6,1
nad 50 do 100	0,50	4,8
nad 100 do 200	0,40	3,8
nad 200 do 500	0,30	2,9
více než 500	0,20	2,2

B. Zkouška odolnosti skleněné drti proti vodě.

Postup. Zkoušené obaly se vypláchnou *vodou R* a vysuší se v horkovzdušné sušárně. Kladivem se nahrubo rozdrtí asi 100 g skla nejméně ze tří obalů. Největší střepy nemají být větší než 25 mm. Část vzorku se umístí do hmoždíře a vloží se tlouček, na který se jednou silně udeří kladivem. Obsah hmoždíře se vysype na nejhrubší síto (710) v sadě sít. Tento postup se opakuje, až se na síto umístí všechny střepy. Obsah se rychle přeseje a odstraní se část, která zůstala na sítech (710) a (425). Tato část se znovu popsaným způsobem drtí a celý postup se opakuje, až na sítě (710) zůstane asi 20 g skla. Tato část a část, která prošla sítem (250), se odstraní. Síty se 5 min ručně nebo mechanicky třepe. Dále se zkouší ta část skleněné drtě, která prošla sítem (425) a zachytila se na sítě (250). Pomocí magnetu, kterým se pohybuje nad rozprostřenou drtí, se z ní odstraní kovové částice. Asi 22 g drtě se převede do kuželové baňky s 60 ml *acetonu R*, protřepává se do vzniku suspenze, ta se potom nechá usadit a tekutina se sleje. Protřepávání s acetonem se opakuje pětkrát,

potom se drť rozprostře na odpařovací misce. Aceton se nechá odpařit, drť se 20 min suší v sušárně při 110 °C a nechá se vychladnout.

20 g sušené skleněné drtě se převede do 250ml kuželové baňky, přidá se 100 ml *vody R* a zváží se. Do druhé stejné baňky se převede 100 ml *vody R* a také se zváží (slepá zkouška). Skleněná drť se rozprostře rovnoměrně po dně baňky a obě baňky se přiklopí skleněnými miskami z neutrálního skla nebo hliníkovou fólií opláchnutou ve vodě. Baňky se v autoklávu zahřívají 30 min při 121 °C, přičemž se provede postup podobně, jak je popsán ve zkoušce A odolnosti vnitřního povrchu proti vodě. Po ochlazení se sejmou víčka, baňky se opatrně otřou a doplní se *vodou R* na původní hmotnost.

Titrace. 50,0 ml čirého výluhu (odpovídá 10,0 g skleněné drti) se převede do kuželové baňky. Současně se provede slepá zkouška s 50,0 ml *vody R* (kontrolní roztok). Do každé baňky se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l VS*. Zkoušený výluh i kontrolní roztok se titrují stejnou kyselinou do stejného zbarvení. Spotřeba na kontrolní roztok se odečte od spotřeby na zkoušený výluh a výsledky se vyjádří v mililitrech *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* na 10,0 g skla.

Hodnocení. Spotřeba *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS na 10,0 g* skla je u obalů:
- třídy I nejvýše 2,0 ml,
- třídy II a III nejvýše 17,0 ml,
- třídy IV nejvýše 30,0 ml.

C. Zkouška odolnosti proti vodě po leptání povrchu obalů.

Počet obalů pro zkoušku a požadovaný objem zkoušené kapaliny jsou uvedeny v tabulce 3.2.1-1.

Postup. Obaly se dvakrát vypláchnou *vodou R*, naplní se až po okraj směsí *kyseliny fluorovodíkové R* a *kyseliny chlorovodíkové R* a nechají se 10 min stát. Potom se obaly vyprázdní, pečlivě se pětkrát vypláchnou *vodou R* a ještě jednou se vypláchnou *vodou R* těsně před zkouškou. Takto připravené obaly se autoklávují a titrují postupem popsaným ve zkoušce A odolnosti vnitřního povrchu proti vodě.

Rozlišení mezi skleněnými obaly třídy I a třídy II

Výsledky zkoušky C se porovnají s výsledky zkoušky A. Rozdíly jsou uvedeny v tabulce 3.2.1-3.

Tab. 3.2.1-3 Rozlišení mezi skleněnými obaly třídy I a třídy II

Třída I	Třída II
Hodnoty jsou blízké hodnotám zjištěným zkouškou A pro odolnost vnitřního povrchu proti vodě pro skleněné obaly třídy I.	Hodnoty výrazně převyšují hodnoty zjištěné zkouškou A pro odolnost vnitřního povrchu proti vodě pro skleněné obaly třídy I a jsou podobné, ale nepřevyšují hodnoty pro skleněné obaly třídy III.

Arsen

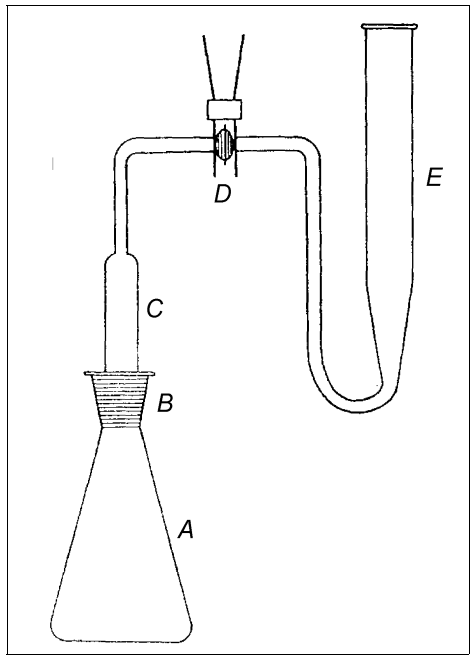
Zkouška se provádí u skleněných obalů určených pro vodné parenterální přípravky.

Zařízení. Zařízení, viz obrázek 3.1.2-2, sestává z vyvíječe arsenovodíku (A) připojeného přes čistič plynu (C) k absorpční trubici. Části jsou spojeny standardním kuželovým nebo kloubovým zábrusem (B a D). Lze použít jakékoli jiné uspořádání využívající shodného principu.

Zkoušený roztok. Do vyvíjecí baňky (A) se převede 35 ml výluhu připraveného ze skleněného obalu pro vodné parenterální přípravky postupem podle zkoušky A pro odolnost vnitřního povrchu proti vodě. U menších obalů se použije 35 ml výluhu získaného spojením výluhů z více obalů.

Porovnávací roztok. 3,5 ml základního *roztoku arsenu (1 µg As/ml)* se zředí *vodou R* na 35 ml a převede se do vyvíjecí baňky (A).

Postup. Zkoušený výluh a porovnávací roztok se zpracovávají za stejných podmínek tak, že se ve vyvíjecích baňkách smíchají s 20 ml roztoku *kyseliny sírové R* (350 g/l), 2 ml *jodidu draselného RS*, 0,5 ml *chloridu cínatého RS* a 1 ml *2-propanolu R* a směs se nechá 30 min stát. Do čističe plynu (C) se vloží dva smotky *vaty s octanem olovnatým R* tak, aby mezi nimi byla mezera 2 mm. Zábrusy (B a D) se potřou vhodným mazivem a spojí se čisticí (C) a absorpční jednotka (E). Do absorpční trubice (E) se převedou 3,0 ml roztoku *diethyldithiokarbaminanu stříbrného R* (5 g/l) v *pyridinu bezvodém R*. Do směsi ve vyvíjecí baňce (A) se přidají 3,0 g *zinku R* granolovaného (710) a baňka se ihned připojí k sestavené čisticí a absorpční jednotce. Vyvíjecí baňka (A) se ponoří do vodní lázně termostatované na (25 ± 3) C. Vyvíjí se vodík a současně se roztok zbarvuje. Baňkou se v intervalech asi 10 min mírně zakrouží; po 45 min se absorpční trubice odpojí od vyvíječe a čističe a roztok se převede do zkumavky pro porovnávací zkoušky (*2.1.5*). Červené zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku. Vyhodnocení lze také provést spektrofotometrem nebo kolorimetrem za použití roztoku diethyldithiokarbaminanu stříbrného jako kontrolního roztoku při 535 nm až 540 nm v 1cm vrstvě. Zkoušený roztok obsahuje nejvýše 0,1 µg As/g.



Obr. 3.2.1-2 Zařízení k určení arsenu

Světelná propustnost barevných skleněných obalů chránících před světlem

Příprava vzorku. Skleněný obal se rozbije nebo rozřeže okružní pilou se smáčeným karborundovým nebo diamantovým brusným kotoučem. Vyberou se části s reprezentativní tloušťkou stěny a oříznou se na vhodný rozměr pro uchycení ve spektrometru. Jestliže je vzorek příliš malý a nezakryje otvor v držáku vzorku a je kratší než štěrbina spektrometru, nezakrytá část se překryje neprůsvitným papírem nebo páskou. Před měřením se vzorek umyje, vysuší a otře optickým papírem. Vzorek se upevní v držáku pomocí vosku nebo jiným vhodným způsobem, přičemž je třeba se vyvarovat přítomnosti otisků prstů nebo jiného znečištění na zkoušeném vzorku.

Postup. Vzorek se umístí ve spektrometru tak, že jeho podélná osa je souběžná se štěrbinou spektrometru a paprsek spektrometru dopadá na povrch vzorku kolmo, aby se snížily světelné reflexní ztráty na minimum. Propustnost vzorku se měří proti vzduchu v oblasti 290 nm až 450 nm vcelku nebo v intervalech 20 nm.

Hodnocení. Světelná propustnost barevného skla obalů pro přípravky, které nejsou určeny pro parenterální použití, je nejvýše 10 % v oblasti 290 nm až 450 nm bez ohledu na třídu a objem skleněného obalu. Světelná propustnost barevného skla obalů pro parenterální přípravky nepřevyšuje limitní hodnoty uvedené v tabulce 3.2.1-4.

Tab. 3.2.1-4 Limitní hodnoty světelné propustnosti barevných skleněných obalů třídy I, II a III

Jmenovitý objem v ml	Nejvyšší přípustná hodnota světelné propustnosti při 290 nm až 450 nm v %	
	zatavené obaly	obaly s uzávěrem
do 1	50	25
nad 1 do 2	45	20
nad 2 do 5	40	15
nad 5 do 10	35	13
nad 10 do 20	30	12
nad 20	15	10

Obaly na krev a krevní složky

Odolnost proti náhlé změně teploty.

Obaly se nerozbijí, nepopraskají nebo nepuknou, jestliže jsou vystaveny následujícím podmínkám:

a) prázdné obaly se umístí do autoklávu, teplota se během asi 30 min zvýší na 140 °C a při této teplotě se ponechají 30 min;
b) prázdné obaly se umístí do sušárny, teplota se během asi 30 min zvýší na 250 °C a při této teplotě se ponechají 1 h;
c) obaly se naplní do 70 % nejvyššího vyznačeného objemu roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) a postupně se na vzduchu ochladí na -20 °C a ponechají se při této teplotě 24 h. Po ohřátí na pokojovou teplotu vyhovují obaly zkoušce odolnosti při odstřeďování;
d) obaly se naplní vodou a podrobí se rychlému poklesu teploty střídavým ponořením do dvou vodních lázní s teplotami lišícími se nejméně o 40 °C.

Odolnost proti odstřeďování.

Obal se úplně naplní *vodou R* až po nejvyšší vyznačený objem a vloží se do vhodné odstředivky. Odstředivka se vyváží a odstřeďuje se tak, aby se nejdéle do 1 min dosáhlo zrychlení 2000 g_n Obal odolá těmto podmínkám nejméně 30 min.

Označování

Obaly na krev a krevní složky se označují v souladu s příslušnými národními předpisy a mezinárodními dohodami.

3.2.2 Obaly a uzávěry z plastů

Jsou to výrobky pro farmaceutické použití určené k uchovávání a ochraně léčiv a jsou nebo mohou být v přímém styku s léčivy. Uzávěr je součástí obalu.

Materiály pro výrobu farmaceutických obalů obsahují jeden nebo více druhů polymerů, v nichž mohou být i určité přísady. Tyto materiály nesmějí obsahovat žádnou látku, která by se mohla do obsahu vyluhovat v množství ovlivňujícím účinnost nebo stabilitu přípravku nebo zvyšovat jeho toxicitu.

Nejčastěji používanými polymery jsou polyethylen, polypropylen, polyvinylchlorid, polyethylentereftalat a kopolymery ethylenu a vinylacetatu.

Druh a množství přísad se řídí druhem použitého polymeru, zpracovatelským postupem a účelem použití. Přísadami mohou být antioxidanty, stabilizátory, změkčovadla, maziva, barviva a látky zvyšující rázovou houževnatost. Antistatická činidla a separační přísady se smějí používat jedině u obalů na přípravky k perorálnímu a zevnímu použití, pro něž jsou povoleny. Vhodné přísady pro každý typ polymeru jsou uvedeny v lékopise. Jiné přísady se použijí jen tehdy, jsou-li pro jednotlivý případ schváleny oprávněnou autoritou.

Pro výběr vhodného plastového obalu je nutné znát úplné složení plastu, včetně všech materiálů přidávaných při výrobě obalu, aby mohla být stanovena potenciální rizika. Plastový obal zvolený pro určitý přípravek má tyto vlastnosti:

- složky přípravku se při styku s plastem významně neadsorbují na jeho povrch ani do něj významně nepronikají nebo jím neprostupují,
- složky plastu nepůsobí na přípravek v míře ovlivňující jeho stabilitu nebo nepředstavují toxické riziko.

Z vybraného materiálu nebo materiálů splňujících tyto požadavky se za přesně stanovených podmínek zhotoví určitý počet vzorků jednoho druhu obalu a podrobí se praktickým zkouškám za podmínek, jaké se vyskytují při určeném použití, včetně případné sterilizace. Aby se potvrdila snášenlivost obalu s obsahem a zajistilo se, že nebude ovlivněna kvalita přípravku, provedou se různé zkoušky, jako je ověření stability fyzikálních vlastností, stanovení změn hmotnosti v důsledku propustnosti obalu, zjištění změn hodnoty pH, zhodnocení změn způsobených vlivem světla a chemické a případně též biologické zkoušky.

Výrobní postup zajišťuje reprodukovatelnost hromadné výroby a výrobní podmínky jsou voleny tak, aby se vyloučila možnost znečištění jinými plasty nebo jejich složkami. Výrobce zajišťuje, že obaly ze sériové výroby odpovídají po všech stránkách zkoušeným vzorkům.

Pro zachování platnosti výsledků zkoušek typových vzorků je důležité:

- neprovádět žádné změny ve složení materiálu proti zkoušeným vzorkům;
- neprovádět žádné změny ve výrobním procesu proti přípravě vzorků. Zvláště je nutno vyloučit změny teplot při zpracování plastu, včetně následných operací, jako je sterilizace;
- nepoužívat odpadní materiál.

Přebytečný materiál z výroby, jehož druh a množství je přesně stanoven, smí být znovu použit až po odpovídajícím ověření.

Materiály popsané v lékopise se uznají za vhodné pro uvedené výše definované specifické účely tehdy, vyhoví-li zkouškám snášenlivosti pro každou kombinaci obalu a obsaženého přípravku.

3.2.3 Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky

Obaly z plastů pro sběr, uchovávání, zpracování a podávání krve a jejích složek, dále vaky, jsou vyráběny z jednoho nebo více polymerů, které v případě potřeby obsahují přísady. Složení a podmínky výroby vaků jsou schvalovány oprávněnou autoritou v souladu s národní legislativou a mezinárodními dohodami.

Složení materiálů různých částí vaků odpovídá příslušným specifikacím, jestliže je jejich kvalita kontrolována metodami popsanými v těchto specifikacích.

Jiné materiály než ty, které jsou popsány v lékopise, mohou být použity za podmínky, že jejich složení bylo schváleno oprávněnou autoritou a vaky z nich vyráběné odpovídají požadavkům předepsaným ve stati *Sterilní plastové obaly na lidskou krev a krevní složky*.

Za normálních podmínek používání tyto materiály neuvolňují monomery nebo jiné látky v množstvích vedoucích k poškození nebo abnormálním změnám krve.

Vaky mohou v závislosti na jejich použití obsahovat antikoagulační roztoky a jsou dodávány sterilní.

Každý vak je vybaven přípojkami vhodnými pro určené použití. Vak může být jednoduchý nebo ve formě sběrného vaku, který může sestávat z jednoho vaku propojeného jednou nebo více hadičkami s jedním nebo více sekundárními vaky tak, aby bylo možné provádět separaci krevních složek v uzavřeném systému.

Vývody vaku mají tvar a velikost umožňující odpovídající propojení vaku se zdrojem krve. Ochranné kryty jehly pro odběr krve a připojených částí musí zajišťovat udržení sterility. Musí být snadno odpojitelné a zabezpečené.

Kapacita vaků je vztažena ke jmenovité kapacitě předepsané oprávněnou autoritou a příslušnému objemu antikoagulačního roztoku. Jmenovitá kapacita je objem odebrané krve ve vaku. Vaky mají tvar dovolující odstřeďování v naplněném stavu.

Vaky jsou vybaveny vhodným zařízením pro zavěšení nebo upevnění, které nebrání odběru, skladování, zpracování nebo podávání krve.

Vaky jsou uzavřeny v hermeticky uzavřených ochranných obalech.

Vlastnosti

Vak je dostatečně průhledný, aby bylo možno prohlédnout obsah před a po odběru krve, a je dostatečně pružný, aby kladl minimální odpor v průběhu plnění a vyprazdňování za normálních podmínek použití. Vak obsahuje nejvýše 5 ml vzduchu.

Zkoušky

Roztok S1. Vak se naplní 100 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) prostého pyrogenních látek. Vak se uzavře a zahřívá se 30 min v autoklávu při 110 °C.

Jestliže zkoušený vak obsahuje antikoagulační roztok, předem se vyprázdní a vypláchne 250 ml *vody na injekce R* při (20 ± 1) °C. Promývací tekutina se odstraní.

Roztok S2. Vak se naplní *vodou na injekce R* v množství odpovídajícím určenému objemu antikoagulačního roztoku. Vak se uzavře a zahřívá se 30 min v autoklávu při 110 °C. Po ochlazení se doplní objem *vodou na injekce R* na jmenovitou kapacitu vaku.

Jestliže zkoušený vak obsahuje antikoagulační roztok, předem se vyprázdní a vypláchne stejně, jak je uvedeno výše.

Odolnost při odstřeďování. Vak se naplní na jmenovitou kapacitu *vodou R* okyselenou 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Vak se obalí absorpčním papírem, který byl napuštěn *modří bromfenolovou RS1* nebo jiným vhodným indikátorem a vysušen. Obalený vak se odstřeďuje 10 min při 5000 g_n; na papíru s indikátorem nejsou žádné známky prosakování a nedošlo k žádné trvalé deformaci vaku.

Odolnost proti roztažení. Vak se naplní na jmenovitou kapacitu *vodou R* okyselenou 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Vak se zavěsí za závěs na straně proti hadičce přívodu krve a podél osy hadičky se působí 5 s okamžitou silou 20 N (2,05 kgf). Zkouška se opakuje tak, že se tažnou silou působí na každou část pro plnění a vyprazdňování. Nedochází k roztržení ani poškození vaku.

Netěsnost. Vak po zkoušce odolnosti proti roztažení se vloží mezi dvě desky pokryté absorpčním papírem, který byl napuštěn *modříbromfenolovou RS1* nebo jiným vhodným indikátorem a vysušen. Postupně se zvyšuje síla na desku stlačující vak tak, že vnitřní tlak (tj. rozdíl mezi působícím tlakem a atmosférickým tlakem) dosáhne v průběhu 1 min hodnoty 67 kPa. Tlak se udržuje 10 min a po této době na indikátorovém papíru nejsou u žádného spoje žádné známky prosakování.

Propustnost pro páry. Vak s antikoagulačním roztokem se naplní roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na objem odpovídající objemu krve, pro který je vak určen.

Prázdný vak se naplní stejnou směsí antikoagulačního roztoku a roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Vak se uzavře, zváží a skladuje 21 dní při relativní vlhkosti atmosféry (50 ± 5) % a teplotě (5 ± 1) °C. Úbytek hmotnosti je nejvýše 1 %.

Vyprázdnění pod tlakem. Vak se naplní na jmenovitou kapacitu *vodou R* o teplotě (5 ± 1) °C. Transfuzní souprava bez intravenózní kanyly se připojí k jednomu vývodu. Vak se stlačí tak, aby v průběhu vytlačování byl udržen vnitřní tlak (tj. rozdíl mezi působícím tlakem a atmosférickým tlakem) 40 kPa. Vak se vyprázdní nejdéle za 2 min.

Rychlost plnění. Hadička přívodu krve s jehlou se připojí k zásobníku obsahujícímu vhodný roztok, který má viskozitu stejnou jako krev, např. roztok *sacharosy R* (335 g/l) při 37 °C. Vnitřní tlak zásobníku (tj. rozdíl mezi působícím tlakem a atmosférickým tlakem) se udržuje na 9,3 kPa, přičemž základna zásobníku a horní část vaku se nacházejí ve stejné výši. Vak se za 8 min naplní nejméně na jmenovitou kapacitu.

Odolnost proti teplotním rozdílům. Vak se na vhodném místě vytemperuje na 20 °C až 23 °C. V chladicím boxu se rychle ochladí na -80 °C a při této teplotě se udržuje 24 h. Teplota se zvýší na 50 °C a při této teplotě se udržuje 12 h. Nechá se ochladit na pokojovou teplotu. Vak vyhovuje zkouškám odolnosti při odstřeďování, odolnosti proti roztažení, netěsnosti, propustnosti pro páry, vyprázdnění pod tlakem a rychlosti plnění popsaným výše.

Průhlednost. Vak se naplní na jmenovitou kapacitu základní suspenzí pro opalescenci (*2.2.1*) zředěné tak, aby absorbance (*2.2.25*) při 640 nm byla 0,37 až 0,43 (asi šestnáctinásobné zředění). Zákal suspenze ve vaku musí být pozorovatelný při porovnání s vakem naplněným vodou.

Vyluhovatelné látky. Zkoušky se provádějí postupy navrženými k co nejvěrnějšímu napodobení podmínek styku vaku s jeho obsahem při skutečném použití.

Podmínky styku a zkoušky, které se mají provádět, jsou předepsány podle charakteru materiálu a zvláštních požadavků na každý typ vaku.

Hemolytické účinky v tlumivých roztocích.

Základní tlumivý roztok. 90,0 g *chloridu sodného R*, 34,6 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* a 2,43 g a *dihydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml.
Tlumivý roztok A_o. Ke 30,0 ml základního tlumivého roztoku se přidá 10,0 ml *vody R*.
Tlumivý roztok B_o. Ke 30,0 ml základního tlumivého roztoku se přidá 20,0 ml *vody R*.
Tlumivý roztok C_o. Ke 30,0 ml základního tlumivého roztoku se přidá 85,0 ml *vody R*.

Do tří odstřeďovacích zkumavek se převede po 1,4 ml roztoku S2. Do zkumavky I se přidá 0,1 ml tlumivého roztoku A_o, do zkumavky II se přidá 0,1 ml tlumivého roztoku B_o a do zkumavky III se přidá 0,1 ml tlumivého roztoku C_o. Do každé zkumavky se přidá po 0,02 ml čerstvé heparinizované lidské krve, obsah se důkladně promíchá a zahřívá se 40 min ve vodní lázni při (30 ± 1) °C. Použije se krev odebraná nejdéle 3 h před zkouškou nebo krev odebraná do citrat-fosforečnan-dextrosového antikoagulačního roztoku (CPD) nejdéle 24 h před zkouškou.

Připraví se tři roztoky obsahující:
- roztok A_1: 3,0 ml tlumivého roztoku A_o a 12,0 ml *vody R*,
- roztok B_1: 4,0 ml tlumivého roztoku B_o a 11,0 ml *vody R*,
- roztok C_1: 4,75 ml tlumivého roztoku C_o a 10,25 ml *vody R*.

Do zkumavky I se přidá 1,5 ml roztoku A_1, do zkumavky II se přidá 1,5 ml roztoku B_1 a do zkumavky III se přidá 1,5 ml roztoku C_1. Souběžně a stejným způsobem se připraví další tři zkumavky, v nichž je místo roztoku S2 *voda R*. Všechny zkumavky se současně odstřeďují 5 min

v horizontální odstředivce přesně při 2500 g_n. Po odstředění se změří absorbance (*2.2.25*) tekutin při 540 nm za použití základního tlumivého roztoku jako kontrolního roztoku.

Hemolytický index se vypočte jako procentuální zlomek podle výrazu:

$$\frac{A_{exp} \cdot 100}{A_{100}},$$

v němž značí:

A_{100} - absorbanci zkumavky III,

A_{exp} - absorbanci zkumavky I nebo II nebo odpovídajících kontrolních zkumavek.

Roztok ve zkumavce I dává hemolytický index nejvýše 10 % a hemolytický index roztoku ve zkumavce II se liší nejvýše o 10 % od odpovídající kontrolní zkumavky.

Sterilita (*2.6.1*). Vaky vyhovují zkoušce na sterilitu. Vak se asepticky naplní 100 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a protřepe se tak, aby se celý vnitřní povrch vaku smočil. Obsah vaku se přefiltruje přes membránový filtr a membrána se umístí do vhodné živné půdy, jak předepisuje zkouška na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Roztok S1 vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne 10 ml roztoku.

Neškodnost (*2.6.9*). Roztok S1 vyhovuje zkoušce na neškodnost. Každé myši se vstříkne 0,5 ml roztoku.

Balení

Vaky se balí do ochranných přebalů.

Po vyjmutí z ochranného přebalu vak nevykazuje žádné známky netěsnosti a růstu mikroorganismů.

Ochranný přebal je dostatečně pevný, aby vydržel bez poškození běžné zacházení.

Ochranný přebal je hermeticky uzavřen tak, že ho nelze otevřít a znovu uzavřít, aniž by bylo zjevně zřejmé, že již byl jednou otevřen.

Označování

Vyhovuje odpovídající národní legislativě a mezinárodním dohodám. V označení na obalu se uvede:

- jméno a adresa výrobce,
- číslo šarže, z něhož lze zjistit postup výroby vaku, a materiál, z něhož byl vyroben.

Na štítku je rezervováno místo k zapsání těchto údajů:

- krevní skupiny, referenčního čísla a všech dalších informací vyžadovaných národní legislativou a mezinárodními dohodami a k vložení dodatečného značení.

V označení ochranného přebalu nebo vaku viditelně přes obal jsou uvedeny tyto údaje:

- doba použitelnosti,
- upozornění, že vak, který byl vyjmut z ochranného přebalu, musí být použit nejpozději do 10 dní.

Inkoust, barva nebo jiné látky použité k označení nesmí difundovat do plastu, z něhož je vak vyroben, a popis musí zůstat čitelný po dobu použitelnosti vaku.

3.2.4 Prázdné sterilní obaly z měkčeného polyvinylchloridu na lidskou krev a krevní složky

Jak je uvedeno ve stati Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*), pokud není schváleno jinak, musí povaha a složení materiálů, ze kterých jsou obaly, dále vaky, vyrobeny, vyhovovat požadavkům uvedeným ve stati Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro obaly na lidskou krev a krevní složky a pro obaly na vodné roztoky k intravenózní infuzi (*3.1.1*).

Zkoušky

Vaky vyhovují zkouškám předepsaným ve stati Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*) a dále popsaným zkouškám na vyluhovatelné látky.

Kontrolní roztok. Voda na injekci R se zahřívá 30 min v obalu z borokřemičitého skla v autoklávu při 110 °C.

Oxidovatelné látky. Roztok S2 podle stati *3.2.3* v množství odpovídajícím 8 % jmenovité kapacity vaku se ihned po přípravě roztoku převede do baňky z borokřemičitého skla. Současně se druhá baňka naplní stejným objemem čerstvě připraveného kontrolního roztoku. Ke každému roztoku se přidá 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS* a 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Nechá se stát 15 min ve tmě. Ke každému roztoku se přidá 0,1 g *jodidu draselného R.* Nechá se stát 5 min ve tmě a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku je nejvýše 2,0 ml.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K množství roztoku S2 odpovídajícímu 4 % jmenovité kapacity vaku se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; roztok zůstane bezbarvý. Přidá se 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je růžový. Přidá se 0,8 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžovočervený nebo červený.

Chloridy (*2.4.4*). 15,0 ml roztoku S2 vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,4 µg/ml). Porovnávací roztok se připraví za použití 1,2 ml základního *roztoku chloridů (5 µg Cl/ml)* a 13,8 ml *vody R.*

Amonium (*2.4.1*). 5,0 ml roztoku S2 se zředí *vodou R* na 14,0 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na amonium (2 µg/ml).

Zbytek po odpaření. 100 ml roztoku S2 se odpaří do sucha v kádince z borokřemičitého skla vhodné velikosti předem vyhřáté na 105 °C. Za stejných podmínek se odpaří kontrolní roztok (slepá zkouška). Suší se do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Zbytek po odpaření roztoku S2 váží nejvýše o 3 mg více, než je hmotnost odparku kontrolního roztoku.

Absorbance (*2.2.25*). Změří se absorbance roztoku S2 při 230 nm až 360 nm proti kontrolnímu roztoku. V oblasti 230 nm až 250 nm je absorbance nejvýše 0,30 a v oblasti 251 nm až 360 nm je nejvýše 0,10.

Vyluhovatelný bis(2-ethyhexyl)ftalat. Jako extrakční rozpouštědlo se použije *ethanol R* zředěný *vodou R* tak, aby směs měla relativní hustotu měřenou pyknometrem (*2.2.5*) 0,9389 až 0,9895.

Základní roztok. 0,100 g *bis(2-ethylhexyl)ftalatu R* se rozpustí v extrakčním rozpouštědle a zředí se jím na 100,0 ml.

Porovnávací roztoky:

a) 20,0 ml základního roztoku se zředí extrakčním rozpouštědlem na 100,0 ml,

b) 10,0 ml základního roztoku se zředí extrakčním rozpouštědlem na 100,0 ml,

c) 5,0 ml základního roztoku se zředí extrakčním rozpouštědlem na 100,0 ml,

d) 2,0 ml základního roztoku se zředí extrakčním rozpouštědlem na 100,0 ml,
e) 1,0 ml základního roztoku se zředí extrakčním rozpouštědlem na 100,0 ml.

Změří se absorbance (*2.2.25*) porovnávacích roztoků v absorpčním maximu při 272 nm za použití extrakčního rozpouštědla jako kontrolní tekutiny. Ze závislosti absorbance na koncentraci bis(2-ethylhexyl)ftalatu se sestrojí kalibrační křivka.

Postup extrakce. Prázdný vak se odběrovou hadičkou s jehlou nebo adaptérem naplní do poloviny jmenovité kapacity extrakčním rozpouštědlem předem ohřátým na 37 °C v dobře uzavřené baňce. Z vaku se zcela odstraní vzduch a hadička se uzavře. Naplněný vak se bez třepání ponoří ve vodorovné poloze na (60 ± 1) min do vodní lázně o teplotě (37 ± 1) °C. Vak se vyjme z vodní lázně, pozvolna se desetkrát převrátí a obsah se převede do skleněné baňky. Ihned se změří absorbance při maximu 270 nm proti extrakčnímu rozpouštědlu. Koncentrace bis(2-ethylhexyl)ftalatu v mg na 100 ml extrakčního roztoku se odečte z kalibrační křivky. Koncentrace nepřevyšuje:
- 10 mg/100 ml pro vaky se jmenovitým objemem nad 300 ml a do 500 ml;
- 13 mg/100 ml pro vaky se jmenovitým objemem nad 150 ml a do 300 ml;
- 14 mg/100 ml pro vaky se jmenovitým objemem do 150 ml.

Balení

Viz stať Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*).

Označování

Viz stať Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*).

3.2.5 Sterilní obaly z měkčeného polyvinylchloridu na lidskou krev obsahující antikoagulační roztok

Sterilní obaly, dále vaky, obsahující antikoagulační roztok, který vyhovuje požadavkům stati *Solutiones anticoagulantes et sanguinem humanum*, se používají ke sběru, skladování a podávání krve. Vyhovují popisu a mají vlastnosti uvedené ve stati Prázdné sterilní obaly z měkčeného polyvinylchloridu na lidskou krev a krevní složky (*3.2.4*).

Jak je uvedeno ve stati Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*), a pokud není schváleno jinak, musí povaha a složení materiálů, ze kterých jsou vaky vyrobeny, vyhovovat požadavkům uvedeným ve stati Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro obaly na lidskou krev a krevní složky a pro obaly na vodné roztoky k intravenózní infuzi (*3.1.1*).

Zkoušky

Vaky vyhovují zkouškám předepsaným ve stati Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*) a dále popsaným zkouškám pro měření objemu antikoagulačního roztoku a zkouškám na vyluhovatelné látky.

Objem antikoagulačního roztoku. Vak obsahující antikoagulační roztok se vyprázdní do odměrného válce. Objem se liší od uváděného objemu nejvýše o ±10 %.

Absorbance (*2.2.5*). Změří se absorbance antikoagulačního roztoku z vaku v oblasti 250 nm až 350 nm proti kontrolnímu roztoku, kterým je antikoagulační roztok stejného složení a nebyl ve styku s plastem. Absorbance v maximu při 280 nm je nejvýše 0,5.

Vyluhovatelný bis(2-ethylhexyl)ftalat. Antikoagulační roztok se z vaku opatrně vypustí ohebnou převodní hadičkou. Nálevkou nasazenou na hadičku se vak zcela naplní *vodou R*. Voda se ve vaku ponechá 1 min za mírného promačkávání vaku a poté se zcela vypustí. Vypláchnutí se zopakuje. Vak, který byl uvedeným způsobem vyprázdněn a vypláchnut, vyhovuje zkoušce na vyluhovatelný bis(2-ethylhexyl)ftalat předepsané ve stati Prázdné sterilní obaly z měkčeného polyvinylchloridu na lidskou krev a krevní složky (*3.2.4*).

Balení a značení

Viz stať Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky (*3.2.3*).

3.2.6 Soupravy pro transfuzi krve a krevních složek

Soupravy pro transfuzi krve a krevních složek sestávají z plastové hadičky a k ní připojených částí, které jsou nezbytné pro odpovídající použití soupravy k transfuzi. Soupravy obsahují zařízení k probodnutí uzávěru, krevní filtr, kapací komůrku, regulátor průtoku, připojovací koncovku typu Luer a obvykle též místo, které umožňuje v případě potřeby nástřik z injekce. Jestliže se soupravy mají použít spolu s vaky, které potřebují filtr vzduchu, může být tento filtr vestavěn do zařízení k probodnutí uzávěru, nebo se použije samostatný odvzdušňovač. Komůrka obsahující krevní filtr, kapací komůrka a hlavní hadička jsou průhledné. Výběr materiálů a vlastní provedení soupravy zajišťují, že nedojde k hemolýze. Svými rozměry a provedením soupravy odpovídají platným normám.

Všechny části soupravy, které přicházejí do styku s krví nebo jejími složkami, jsou sterilní a prosté pyrogenních látek. Každá souprava je balena jednotlivě v obalu, který zajišťuje sterilitu obsahu. Soupravy se nesmějí znovu sterilizovat a používat opakovaně. Soupravy pro transfuzi krve a krevních složek se vyrábějí v souladu se zásadami správné výrobní praxe pro prostředky zdravotnické techniky a souvisejícími národními předpisy.

Zkoušky

Zkoušky se provádějí na sterilizovaných soupravách.

Roztok S. Tři soupravy a baňka z borokřemičitého skla na 300 ml se vzájemně propojí do uzavřeného cirkulačního systému. V baňce se termostatem udržuje teplota kapaliny (37 ± 1) °C. Systémem se 2 h rychlostí 1 l/h cirkuluje 250 ml *vody na injekci R* ve směru používaném při transfuzi (např. za použití peristaltické pumpy s co nejkratší vhodnou silikonovou hadičkou). Všechen roztok se shromáždí v baňce a nechá se zchladnout.

Vzhled roztoku S. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 25 ml roztoku S se přidá 0,15 ml *indikátoru směsného BMF RS*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. K 25 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *oranže methylové RS*. K dosažení počátku barevného přechodu se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Absorbance (2.2.25). Absorbance roztoku S měřená při 230 nm až 250 nm je nejvýše 0,30 a při 251 nm až 360 nm je nejvýše 0,15.

Ethylenoxid. Obsah zbytkového ethylenoxidu po sterilizaci ethylenoxidem stanovený dále popsanou metodou je nejvýše 10 µg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 6,4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou *makrogolem 1500 R* (3 g/10 g),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C, teplota detektoru na 150 °C.

Ověří se nepřítomnost interferujících píků, a to buď provedením zkoušky s nesterilizovanou soupravou, nebo za použití jiného chromatografického systému, např.:
- nerezové ocelové kolony délky 3 m a vnitřního průměru 3,2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnované *triskyanoethoxypropanem R* (2 g/10 g),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C, teplota detektoru na 150 °C.

Roztok ethylenoxidu. Připravuje se v digestoři. 50,0 ml *dimethylacetamidu R* se převede do lahvičky na opakovaný odběr na 50 ml. Lahvička se uzavře, zátka se zajistí a zváží se s přesností 0,1 mg. Injekční stříkačka na 50 ml z polyethylenu nebo polypropylenu se naplní plynným *ethylenoxidem R*, který se nechá ve stříkačce asi 3 min. Stříkačka se vyprázdní a znovu se naplní 50 ml plynného *ethylenoxidu R*. Nasadí se injekční jehla a objem plynu ve stříkačce se sníží z 50 ml na 25 ml. Těchto 25 ml ethylenoxidu se pomalu nastříkne do lahvičky za mírného třepání tak, aby nedošlo ke styku kapaliny s jehlou. Lahvička se opět zváží. Zvýšení hmotnosti je 45 mg až 60 mg a zjištěná hodnota se použije k výpočtu přesné koncentrace ethylenoxidu v roztoku (asi 1 g/l).

Postup. Souprava bez obalu se zváží. Nastříhá se na kousky o největším rozměru 1 cm, které se vloží do láhve na 250 ml až 500 ml obsahující 150 ml *dimethylacetamidu R*. Láhev se uzavře vhodným uzávěrem, který se zajistí, a zahřívá se 16 h v sušárně při (70 ± 1) °C. Z horké láhve se odebere 1 ml horkého plynu a nastříkne se na kolonu. Z kalibrační křivky a výšky získaného píku se vypočte množství ethylenoxidu v lahvičce.

Kalibrační křivka. Do sedmi lahviček stejného typu, jako je lahvička pro zkoušený roztok, se převede po 150 ml *dimethylacetamidu R* a do každé lahvičky se přidá jednotlivě 0 ml, 0,05 ml, 0,10 ml, 0,20 ml, 0,50 ml, 1,0 ml a 2,0 ml roztoku ethylenoxidu, tj. asi 0 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg, 1000 µg a 2000 µg ethylenoxidu. Lahvičky se uzavřou, zátky se zajistí a baňky se zahřívají 16 h v sušárně při (70 ± 1) °C. Z každé lahvičky se nastříkne 1 ml horkého plynu do kolony. Z výšky píků a z množství ethylenoxidu v každé lahvičce se sestrojí kalibrační křivka.

Redukující látky. *Zkouška se provede do 4 h od přípravy roztoku S.* Ke 20,0 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS.* Vaří se 3 min a ihned se zchladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a titruje se *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá titrace za použití 20,0 ml *vody na injekce R*. Rozdíl spotřeb odměrného roztoku je nejvýše 2,0 ml.

Cizí částice. Souprava se vstupním koncem naplní roztokem *laurylsíranu sodného R* (0,1 g/l) přefiltrovaným filtrem ze slinutého skla (16) a ohřátým na 37 °C. Roztok se vypustí výstupním koncem a za vhodných světelných podmínek se hodnotí čirost roztoku. Kapalina je čirá a bez viditelných částic a vláken. (Předpokládá se, že prostým okem jsou viditelné částice o průměru nejméně 50 µm.)

Průtoková rychlost. Soupravou se zcela otevřeným regulátorem průtoku se nechá protéci 50 ml roztoku o viskozitě 3 mPa.s (3 cP), např. roztok *makrogolu 4000 R* (33 g/l) při 20 °C. Při hydrostatické výšce 1 m je doba průtoku nejvýše 90 s.

Odolnost v tlaku. Oba konce soupravy a případně vestavěný odvzdušňovač se uzavřou. Výtoková část soupravy se přes regulátor tlaku připojí ke zdroji stlačeného vzduchu. Souprava se ponoří do vody teplé 20 °C až 23 °C. Přetlak se postupně zvyšuje až na 100 kPa a nechá se působit 1 min. Ze soupravy nevycházejí žádné bubliny.

Průhlednost. Jako porovnávací suspenze se použije základní suspenze pro opalescenci (*2.2.1*) zředěná 1 : 8 pro soupravy s hadičkou o vnějším průměru menším než 5 mm a zředěná 1 : 16 pro soupravy s hadičkou o průměru 5 mm nebo větším. Porovnává se souprava s obíhající suspenzí se soupravou stejné šarže, v níž obíhá *voda R*. Opalescence a přítomnost bublinek jsou rozeznatelné.

Zbytek po odpaření. 50,0 ml roztoku S se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se vysuší v sušárně do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Jako porovnávací roztok se použije 50,0 ml *vody na injekci R*. Hmotnost zbytku je nejvýše o 1,5 mg vyšší než u porovnávacího roztoku.

Sterilita (*2.6.1*). Soupravy vyhovují zkoušce na sterilitu. Soupravou, která je označena jako sterilní pouze uvnitř, se nechá protéci 50 ml *tlumivého roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0* (*2.6.12*) a zkouška se provede metodou membránové filtrace.

U souprav, které jsou označeny jako sterilní uvnitř i zevně, se za aseptických podmínek otevře balení:

- pro přímou inokulační metodu se souprava nebo její části převedou do vhodné nádoby obsahující dostatečné množství živné půdy tak, aby souprava nebo její části byly úplně ponořeny.
- pro metodu membránové filtrace se souprava nebo její části převedou do vhodné nádoby obsahující dostatečné množství *tlumivého roztoku chloridu sodného s peptonem o pH 7,0* (*2.6.12*) a nechají se 10 min úplně ponořeny.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). 5 souprav se vzájemně propojí a nechá se jimi protéci 250 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) prostého pyrogenních látek rychlostí nejvýše 10 ml/min. Roztok asepticky zachycený do nádoby prosté pyrogenních látek vyhovuje zkoušce na pyrogení látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne 10 ml roztoku.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda souprava byla sterilizována ethylenoxidem.

3.2.7 Obaly z plastů na vodné roztoky k intravenózní infuzi

Obaly z plastů na vodné roztoky k intravenózní infuzi jsou vyrobeny z jednoho nebo více polymerů, které v případě potřeby obsahují přísady. Obaly popsané v tomto článku nejsou vždy vhodné pro emulze. Z polymerů se nejčastěji používají polyethylen, polypropylen a polyvinylchlorid. Tuto specifikaci je třeba číst v souvislosti se statí *3.2.2* Obaly a uzávěry z plastů.

Obaly se vyrábějí ve formě vaků nebo láhví. Na obalu je místo vhodné pro připojení infuzní soupravy, které je provedeno tak, aby bylo zajištěno jejich bezpečné spojení. Obaly mají také umožňovat nástřik injekce v průběhu použití. Obvykle mají část umožňující zavěšení a odolávající tahu při jejich použití. Obaly musí snášet podmínky sterilizace. Provedení obalu a zvolená metoda sterilizace jsou takové, aby všechny části obalu, které přijdou do styku s infuzním roztokem, byly sterilizovatelné. Obal po uzavření je nepropustný pro mikroorganismy. Obal je odolný vůči poškození při náhlém zmrznutí, ke kterému může dojít nechtěně během dopravy konečného výrobku.

Obaly jsou dostatečně průhledné, aby bylo možné kdykoliv kontrolovat vzhled jejich obsahu, pokud není uvedeno a schváleno jinak.

Prázdné obaly nemají žádné známky poškození, které by mohly způsobovat netěsnosti a naplněné a uzavřené obaly nesmějí vykazovat žádný únik kapaliny.

Pro vyhovující uskladnění některých přípravků se vyžaduje, aby obal byl uzavřen v ochranném přebalu. Základní vyhodnocení vlivu uchovávání se provádí s obalem uzavřeným v přebalu.

Zkoušky

Roztok S. Obal se naplní na jmenovitou kapacitu *vodou R* a uzavře se obvyklým uzávěrem nebo fólií z čistého hliníku. Obal s vodou se ohřeje v autoklávu během 20 min až 30 min na teplotu (121 ± 2) °C, při které se ponechá 30 min. Pokud tato teplota poškozuje obal, zahřívá se 2 h při 100 °C. *Roztok se použije nejpozději 4 h po přípravě.*

Kontrolní roztok. Připraví se zahříváním *vody R* v borokřemičité baňce uzavřené fólií z čistého hliníku po stejnou dobu a při stejné teplotě jako roztok S.

Vzhled roztoku S. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K množství roztoku S odpovídajícímu 4 % jmenovité kapacity obalu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je růžový. Přidá se 0,8 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 0,1 ml *červeně methylové RS*; roztok je oranžovočervený nebo červený.

Absorbance (*2.2.25*). Změří se absorbance roztoku S při 230 nm až 360 nm proti kontrolnímu roztoku (viz roztok S). Absorbance je nejvýše 0,20.

Oxidovatelné látky. Ke 20,0 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*, vaří se 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS*. Provede se slepá zkouška se 20,0 ml kontrolního roztoku. Rozdíl spotřeb odměrného roztoku je nejvýše 1,5 ml.

Průhlednost. Obal použitý k přípravě roztoku S se naplní na jmenovitou kapacitu zředěnou suspenzí pro opalescenci. Základní suspenze pro opalescenci (*2.2.1*) se zředí 1 : 200 pro obaly z polyethylenu nebo polypropylenu a 1 : 400 pro ostatní obaly. Zákal suspenze je zřetelný při pohledu přes obal a při srovnání s obalem naplněným *vodou R*.

Označování

V označení na obalu každé šarže prázdných obalů se uvede:
- jméno a adresa výrobce,
- číslo šarže, z něhož lze zjistit postup výroby obalu, včetně použitých materiálů.

3.2.8 Sterilní injekční stříkačky z plastů na jedno použití

Sterilní injekční stříkačky z plastů na jedno použití jsou prostředky zdravotnické techniky k okamžitému upotřebení pro podání injekčních přípravků. Jsou dodávány sterilní a prosté pyrogenních látek, nesmějí se znovu sterilizovat ani opakovaně používat. Sestávají z válcovitého pláště a pístu, který může mít těsnící prstenec z elastomeru. Mohou být opatřeny injekční jehlou, která může být nesnímatelná. Každá injekční stříkačka má vlastní ochranný obal k zajištění sterility.

Válcovitý plášť injekční stříkačky je dostatečně průhledný, aby bez obtíží umožňoval odečítání dávek a rozeznání vzduchových bublin a cizích částic.

Plastické a elastomerní materiály, z nichž jsou zhotoveny plášť a píst, vyhovují příslušné specifikaci nebo požadavkům oprávněné autority. Nejpoužívanějšími materiály jsou polypropylen a polyethylen. Svými rozměry a provedením odpovídají injekční stříkačky platným normám.

Pro hladký pohyb pístu je možno potřít vnitřní stěnu válcovitého pláště silikonovým olejem (*3.1.8*), ve stříkačce však nesmí zůstat žádný přebytek, který by mohl znečistit obsah stříkačky v době použití.

Barvy a lepidla používaná ke značení stříkačky nebo obalu, a případně při sestavování stříkačky a jejího obalu, nesmějí pronikat stěnou stříkačky.

Zkoušky

Roztok S. Roztok se připravuje tak, aby nedošlo k jeho znečištění cizími částicemi. Použije se dostatečný počet injekčních stříkaček, aby bylo možno připravit 50 ml roztoku; jmenovitý objem stříkaček se naplní *vodou na injekci R* a ponechá se 24 h při 37 °C. Obsahy injekčních stříkaček se spojí ve vhodné nádobě z borokřemičitého skla.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1)*, bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*) a prakticky bez cizích pevných částic.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 20,0 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* nebo *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S měřená při 220 nm až 360 nm je nejvýše 0,40.

Ethylenoxid. Obsah zbytkového ethylenoxidu po sterilizaci ethylenoxidem stanovený dále popsanou metodou je nejvýše 10 µg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 6,4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou *makrogolem 1500 R* (3 g/10 g),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C, teplota detektoru na 150 °C.

Ověří se nepřítomnost interferujících píků, a to buď provedením zkoušky s nesterilizovanou stříkačkou, nebo za použití jiného chromatografického systému, např.:
- nerezové ocelové kolony délky 3 m a vnitřního průměru 3,2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou *triskyanoethoxypropanem R* (2 g/10 g),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C, teplota detektoru na 150 °C.

Roztok ethylenoxidu. Připravuje se v digestoři. 50,0 ml *dimethylacetamidu R* se převede do lahvičky na opakovaný odběr na 50 ml. Lahvička se uzavře, zátka se zajistí a zváží se s přesností 0,1 mg. Injekční stříkačka na 50 ml z polyethylenu nebo polypropylenu se naplní plynným *ethylenoxidem R*, který se nechá ve stříkačce asi 3 min. Stříkačka se vyprázdní a znovu se naplní 50 ml plynného *ethylenoxidu R*. Nasadí se injekční jehla a objem plynu ve stříkačce se sníží z 50 ml na 25 ml. Těchto 25 ml ethylenoxidu se pomalu nastříkne do lahvičky za mírného třepání tak, aby nedošlo

ke styku kapaliny s jehlou. Lahvička se opět zváží. Zvýšení hmotnosti je 45 mg až 60 mg a zjištěná hodnota se použije k výpočtu přesné koncentrace ethylenoxidu v roztoku (asi 1 g/l).

Kalibrační křivka. Do sedmi lahviček stejného typu, jako je lahvička pro zkoušený roztok, se převede po 150 ml *dimethylacetamidu R* a do každé lahvičky se přidá jednotlivě 0 ml, 0,05 ml, 0,10 ml, 0,20 ml, 0,50 ml, 1,0 ml a 2,0 ml roztoku ethylenoxidu, tj. asi 0 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 500 µg, 1000 µg a 2000 µg ethylenoxidu. Lahvičky se uzavřou, zátky se zajistí a baňky se zahřívají 16 h v sušárně při (70 ± 1) °C. Z každé lahvičky se nastříkne 1 ml horkého plynu do kolony. Z výšky píků a z množství ethylenoxidu v každé lahvičce se sestrojí kalibrační křivka.

Postup. Stříkačka bez obalu se zváží, rozřeže se na kousky o největším rozměru 1 cm, které se vloží do láhve na 250 ml až 500 ml obsahující 150 ml *dimethylacetamidu R*. Láhev se uzavře vhodným uzávěrem, který se zajistí, a zahřívá se 16 h v sušárně při (70 ± 1) °C. Z horké láhve se odebere 1 ml horkého plynu a nastříkne se na kolonu. Z kalibrační křivky a výšky získaného píku se vypočte množství ethylenoxidu v láhvi.

Silikonový olej. Vypočítá se plocha vnitřního povrchu injekční stříkačky (*S*) v cm ^{2} podle vztahu:

$$2\sqrt{V.\pi.h}\ ,$$

v němž značí:
V - jmenovitý objem injekční stříkačky v cm^3,
h - výšku stupnice v cm.

Vezme se takový počet injekčních stříkaček, aby jejich celkový vnitřní povrch byl 100 cm^2 až 200 cm^2. Každá stříkačka se naplní na polovinu jmenovitého objemu *dichlormethanem R* a zbylý objem se doplní vzduchem. Otvor k nasazení jehly se uzavře prstem překrytým fólií z plastu inertního k dichlormethanu. Stříkačka se desetkrát obrátí tak, že se opláchne celý vnitřní povrch odpovídající jmenovitému objemu. Získané výluhy ze všech stříkaček se převedou do zvážené misky a celý postup se opakuje. Spojené výluhy se odpaří na vodní lázni do sucha a suší se 1 h při 100 °C až 105 °C. Zbytek po odpaření odpovídající 1 cm ^{2} plochy vnitřního povrchu váží nejvýše 0,25 mg.

Změří se infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zbytku, které vykazuje charakteristické pásy silikonového oleje při 2960 cm^{-1}, 1260 cm^{-1}, 1095 cm^{-1}, 1020 cm^{-1} a 805 cm^{-1}.

Redukující látky. Ke 20,0 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*, 3 min se vaří a ihned se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a titruje se *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška za použití 20,0 ml *vody na injekci R*. Rozdíl spotřeb odměrného roztoku je nejvýše 3,0 ml.

Průhlednost. Injekční stříkačka se naplní základní suspenzí pro opalescenci (*2.2.1*) zředěnou 1 : 10. Základní suspenze se před použitím nechá stát 24 h při teplotě (20 ± 2) °C. Druhá stejná stříkačka se naplní *vodou R* a v rozptýleném světle se prostým okem porovnávají obě stříkačky proti tmavému pozadí. Opalescence suspenze je zřetelná při porovnání se stříkačkou naplněnou vodou.

Sterilita (*2.6.1*). *Injekční stříkačky označené jako sterilní vyhovují zkoušce na sterilitu provedené následovně.* Aseptickým postupem se otevře obal, stříkačka se vyjme a rozebere. Každá část se jednotlivě vloží do vhodné nádoby obsahující dostatek živné půdy k úplnému zaplavení vložené části. Použijí se obě doporučené živné půdy (*2.6.1*).

Injekční stříkačky označené jako sterilní pouze uvnitř vyhovují zkoušce na sterilitu provedené následovně. Asepticky se sejme kryt jehly a jehla se ponoří do 50 ml živné půdy. Stříkačka se pětkrát propláchne povytažením pístu až do jeho nejvyšší polohy.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Injekční stříkačky se jmenovitým objemem 15 ml nebo větším vyhovují zkoušce na pyrogenní látky. Nejméně tři injekční stříkačky se naplní na jmenovitý objem roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) prostého pyrogenních látek a udržují se 2 h při teplotě 37 °C. Roztoky se asepticky smíchají v nádobě prosté pyrogenních látek a ihned se provede zkouška na pyrogenní látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne 10 ml roztoku.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- číslo šarže,
- označení injekční stříkačky,
- upozornění, že stříkačka je určená k jednorázovému použití.

V označení na vnějším obalu se uvede:
- způsob sterilizace,
- zda je stříkačka sterilní nebo zda je sterilní pouze její vnitřní povrch,
- jméno a adresa výrobce,
- upozornění, že stříkačka nesmí být použita, je-li obal poškozen nebo je-li uvolněn ochranný kryt zaručující sterilitu.

3.2.9 Pryžové uzávěry obalů na vodné přípravky k parenterálnímu použití

Vyrábějí se z materiálů získaných vulkanizací (příčným zesítěním) makromolekulárních organických látek (elastomery), které obsahují příslušné přísady. Elastomery se vyrábějí z přírodních nebo syntetických látek polymerizací, polyadicí nebo polykondenzací. Vlastnosti základních složek a různých přísad (např. vulkanizační látky, urychlovače, stabilizátory, pigmenty) závisí na požadovaných vlastnostech konečného výrobku.

Specifikace v tomto článku zahrnuje také uzávěry obalů na prášky a lyofilizované přípravky, které se rozpouštějí ve vodě těsně před použitím. Specifikace nezahrnuje uzávěry ze silikonových elastomerů (viz stať *3.1.9* Silikonový elastomer pro uzávěry a hadičky) a vrstvené uzávěry nebo lakované uzávěry.

Pryžové uzávěry se člení do dvou skupin: typ I jsou uzávěry, které splňují nejpřísnější požadavky a jimž by měla být dávána přednost; typ II jsou uzávěry, které mají mechanické vlastnosti vhodné pro zvláštní použití (např. umožňují mnohonásobný vpich) a vzhledem ke svému chemickému složení nemusí vyhovovat přísným požadavkům pro první kategorii.

Uzávěry zvolené pro použití s určitým přípravkem splňují tyto požadavky:
- složky přípravku se při styku s uzávěrem neadsorbují na jeho povrch ani do něho nebo jím neprocházejí v množství, které by nepříznivě ovlivnilo přípravek,
- uzávěry neuvolňují do přípravku látky v množství ovlivňujícím jeho stabilitu nebo vyvolávajícím riziko toxicity.

Uzávěry jsou snášenlivé s přípravky, pro něž jsou určeny, po celou dobu jejich použitelnosti.

Výrobce přípravku musí od dodavatele dostat záruku, že složení uzávěrů je neměnné a že je shodné se složením uzávěrů použitých při zkouškách snášenlivosti. Jestliže dodavatel informuje výrobce přípravku o změnách ve složení, musí se zkoušení snášenlivosti částečně nebo úplně zopakovat, v závislosti na povaze změn.

Uzávěry se před použitím omývají a mohou být sterilizovány.

Vlastnosti

Pryžové uzávěry jsou pružné, průsvitné nebo neprůhledné a nemají žádnou charakteristickou barvu, která závisí na použitých přísadách. Jsou prakticky nerozpustné v tetrahydrofuranu, který však může uzávěry značně, ale vratně bobtnat. Jsou homogenní a prakticky bez vad odlitku a náhodných příměsí (např. vláken, cizích částic, zbytků pryže).

Zjišťování typu pryže použité k výrobě uzávěru je mimo rámec tohoto článku. Dále uvedená zkouška totožnosti rozlišuje elastomerní a neelastomerní uzávěry, ale nerozlišuje různé druhy pryže. Další zkoušky totožnosti lze provést s cílem zjistit rozdíly mezi určitou šarží a uzávěry použitými k ověřování snášenlivosti. K těmto účelům je možné použít jednu nebo více analytických metod: stanovení relativní hustoty, stanovení síranového popela, stanovení obsahu síry, tenkovrstvou chromatografii extraktu, ultrafialovou absorpční spektrofotometrii extraktu a infračervenou absorpční spektrofotometrii pyrolyzátu.

Zkouška totožnosti

Pružnost. Proužek materiálu o průřezu 1 mm^2 až 5 mm^2 lze rukou protáhnout nejméně na dvojnásobek původní délky. Po 1 min natažení na dvojnásobek délky se proužek za 30 s od uvolnění smrští nejméně na 1,2násobek původní délky.

Zkoušky

Roztok S. Několik nerozřezaných uzávěrů o celkovém povrchu asi 100 cm^2 se vaří 5 min ve *vodě R* ve vhodné skleněné nádobě. Uzávěry se pětkrát promyjí chladnou vodou a převedou se do širokohrdlé baňky (sklo třídy I, *3.2.1*), přidá se 200 ml *vody R* na 100 cm^2 povrchu uzávěrů a zváží se. Hrdlo baňky se zakryje hliníkovou fólií nebo kádinkou z borokřemičitého skla. Baňka se umístí do autoklávu a teplota se během 20 min až 30 min zvedne na (121 ± 2) °C a při této teplotě se zahřívá 30 min. Baňka se nechá pozvolna (asi 30 min) chladnout na pokojovou teplotu a doplní se *vodou R* na původní hmotnost. Obsah se protřepe a výluh se ihned sleje. Před každou zkouškou se roztok S znovu protřepe.

Kontrolní roztok. Připraví se stejným způsobem jako roztok S za použití 200 ml *vody R*, ale bez uzávěrů.

Vzhled roztoku S. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II pro uzávěry typu I a ne více než porovnávací suspenze III pro uzávěry typu II (*2.2.1*). Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 20,0 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* a ke změně zbarvení na žluté se spotřebuje nejvýše 0,8 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Absorbance. *Zkouška se provede do 4 h od přípravy roztoku S*. Roztok S se zfiltruje membránovým filtrem o velikosti pórů asi 0,5 µm. První podíl filtrátu se odstraní. Změří se absorbance (*2.2.25*) filtrátu při 220 nm až 360 nm proti kontrolnímu roztoku. V uvedené oblasti je absorbance výluhu z uzávěrů typu I nejvýše 0,2 a z uzávěrů typu II nejvýše 4,0. V případě potřeby se filtrát před měřením zředí a naměřená hodnota se přepočítá na původní roztok.

Redukující látky. *Zkouška se provede do 4 h od přípravy roztoku S*. Ke 20,0 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 20,0 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Vaří se 3 min a rychle se ochladí. Přidá se 1 g *jodidu draselného R* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,01 mol/l VS* za použití 0,25 ml *škrobu RS* jako indikátoru.Provede se slepá zkouška s 20,0 ml kon-

trolního roztoku. Rozdíl spotřeb odměrného roztoku je nejvýše 3,0 ml pro uzávěry typu I a nejvýše 7,0 ml pro uzávěry typu II.

Těžké kovy (2.4.8). Roztok S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2 µg/ml). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 µg Pb/ml)*.

Rozpustný zinek. Roztok S obsahuje nejvýše 5 µg Zn/ml; stanoví se atomovou absorpční spektrofotometrií (*2.2.23, Metoda I*; použije se jeden porovnávací roztok).

Zkoušený roztok. K 10,0 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml základního *roztoku zinku (5 mg Zn/ml)* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Změří se absorbance při 214 nm.

Amonium. 5,0 ml roztoku S se v případě potřeby zalkalizuje *hydroxidem sodným RS* a zředí se *vodou R* na 15,0 ml. Přidá se 0,3 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS*. Porovnávací roztok se připraví za použití 10,0 ml základního *roztoku amoniaku (1 µg NH_4/ml)*, který se zalkalizuje stejně jako zkoušený roztok, zředí se *vodou R* na 15,0 ml a přidá se 0,3 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS*. Po 30 s je žluté zbarvení zkoušeného roztoku nejvýše stejně intenzivní jako zbarvení porovnávacího roztoku (2 µg/ml).

Zbytek po odpaření. 50,0 ml roztoku S se odpaří na vodní lázni do sucha a vysuší při 100 °C až 105 °C. Hmotnost zbytku je nejvýše 0,2 mg pro uzávěry typu I a nejvýše 4,0 mg pro uzávěry typu II.

Těkavé sulfidy. Uzávěry o celkovém povrchu (20 ± 1) cm^2, v případě potřeby rozřezané, se převedou do kuželové baňky na 100 ml, přidá se 50 ml roztoku *kyseliny citronové R* (20 g/l). Na ústí baňky se přiloží *papír s octanem olovnatým R* a upevní se přiložením obrácené váženky. Zahřívá se 30 min v autoklávu při (121 ± 1) °C. Černá skvrna na papíru je nejvýše stejně intenzivní jako skvrna porovnávacího roztoku, který byl připraven současně stejným způsobem za použití 0,154 mg *sulfidu sodného R* a 50 ml roztoku *kyseliny citronové R* (20 g/l).

Pro zkoušky prostupnosti, drobivosti a těsnosti po vpichu se uzávěry připraví tak, jak je popsáno při přípravě roztoku S, a nechají se uschnout.

Prostupnost. Tato zkouška se provede s uzávěry určenými k propíchnutí injekční jehlou. 10 vhodných lahviček se naplní na jmenovitý objem *vodou R* a uzavřou se zkoušenými uzávěry, které se zajistí běžným způsobem. Pro každý uzávěr se použije nová silikonovaná dlouze zkosená injekční jehla (úhel zkosení 10° až 14°, viz ISO 7864 Sterilní injekční jehly pro jednorázové použití) s vnějším průměrem 0,8 mm, kterou se uzávěr probodne kolmo k povrchu. Síla potřebná k probodnutí se stanoví s přesností ±0,25 N (25 gf), je u všech uzávěrů nejvýše 10 N (1 kgp).

Drobivost. Tato zkouška se provede s uzávěry určenými k propíchnutí injekční jehlou. Jsou-li uzávěry určeny pro vodné přípravky, naplní se dvanáct čistých lahviček *vodou R* 4 ml pod jmenovitý objem lahvičky. Lahvičky se uzavřou zkoušenými uzávěry, které se zajistí obvyklým způsobem, a nechají se stát 16 h. Jsou-li uzávěry určeny pro tuhé přípravky, uzavře se dvanáct čistých lahviček zkoušenými uzávěry. Silikonovaná dlouze zkosená injekční jehla (úhel zkosení 10° až 14°, viz ISO 7864 Sterilní injekční jehly pro jednorázové použití) s vnějším průměrem 0,8 mm se nasadí na čistou injekční stříkačku. Do lahvičky se vstříkne 1 ml *vody R* a odebere se 1 ml vzduchu; tento postup se opakuje čtyřikrát. Každý uzávěr se probodne čtyřikrát na jiném místě, pro každý uzávěr se použije nová jehla a dbá se na to, aby se jehla při zkoušce neotupila. Obsah lahvičky se zfiltruje filtrem o velikosti pórů asi 0,5 µm a úlomky pryže viditelné prostým okem se spočítají. Celkový počet úlomků je nejvýše pět. Tento limit vychází z předpokladu, že úlomky o průměru 50 µm

a větším jsou viditelné prostým okem. V případě pochybnosti nebo rozporu se úlomky pozorují mikroskopem k ověření jejich původu a velikosti.

Těsnost po vpichu. Tato zkouška se provede s uzávěry určenými pro opakovaný injekční odběr. Deset vhodných lahviček se naplní na jmenovitý objem *vodou R* a uzavřou se zkoušenými uzávěry, které se zajistí obvyklým způsobem. Pro každý uzávěr se použije nová injekční jehla s vnějším průměrem 0,8 mm, kterou se uzávěr desetkrát probodne pokaždé na jiném místě. Lahvičky se ponoří ve svislé poloze do roztoku *modři methylenové R* (1 g/l) a vnější tlak se sníží na 10 min o 27 kPa. Tlak se vyrovná a lahvičky se nechají ještě 30 min ponořeny. Lahvičky se vyjmou a povrch se opláchne. V žádné lahvičce nejsou stopy zbarvení obsahu.

4 Zkoumadla

Názvy všech druhů zkoumadel použitých v Českém lékopise jsou psány kurzívou a obvykle označovány písmeny za názvem zkoumadla tak, aby na první pohled bylo patrno, o jaký druh zkoumadla se jedná.

Základní zkoumadla se značí písmenem R. Pokud je zkoumadlo označeno RS, znamená to, že se jedná o roztok zkoumadla, v názvu zkoumadla se již slovo roztok neuvádí.

V případě porovnávacích roztoků pro limitní zkoušky a u tlumivých roztoků se písmena za názvem neuvádějí, jejich názvy vyjadřují přesně druh zkoumadla.

Jakost základních látek pro odměrnou analýzu vyjadřují písmena VR a odměrné roztoky se označují VS.

Je-li třeba vyjádřit přípravu roztoku ze zkoumadla uvedeného ve stati (4.1), píše se kurzívou pouze název lékopisného zkoumadla. Současně se srozumitelně uvede množství a jednotky charakterizující koncentraci roztoku, např.:

"roztok *hydroxidu draselného R* (15 g/l)",
"roztok *kyseliny sírové R* 10% (*V/V*) v *lihu 96% R",*
"roztok *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l HCl)".

4.1 Zkoumadla, roztoky pro limitní stanovení nečistot, tlumivé roztoky

Zkoumadla jsou chemikálie a jejich roztoky používané ke zkoušení léčiv a pomocných látek. K jednoznačné charakterizaci zkoumadel jsou uvedena čísla CAS, viz Obecné zásady (*1.2*).

Zkoumadla nelze používat jako léčivé nebo pomocné látky. Pokud je léčivá nebo pomocná látka zároveň použita jako zkoumadlo, její jakost, pokud je stejná, je uvedena odkazem na lékopisný článek a číslo CAS se již neuvádí.

Roztoky zkoumadel, není-li uvedeno jinak, se rozumějí roztoky vodné připravené z vody čištěné (Aqua purificata) při teplotě obvykle 20 °C. Výjimkou jsou roztoky používané k provedení limitních zkoušek na baryum, vápník a sírany, kde je nutno použít vodu destilovanou.

Při práci a zacházení se zkoumadly je nutno dodržovat bezpečnostní předpisy pro práci v chemických laboratořích (ČSN 01 8003). Pokud mají zkoumadla vlastnosti zvláště nebezpečných jedů, ostatních jedů, omamných látek, psychotropních látek a žíravin, je nutno dodržovat ustanovení nařízení vlády č. 192/1988 Sb. ve znění pozdějších předpisů (182/1990 Sb., 33/1992 Sb. a 278/1993 Sb.). Pokud je zkoumadlo prokazatelným karcinogenem, je nutno dodržovat Hygienické předpisy o hygienických zásadách pro práce s chemickými karcinogeny.

Zkoumadla a jejich roztoky se uchovávají zpravidla v dobře uzavřených obalech. Je-li třeba, jsou předepsány zvláštní podmínky uchovávání. Zkoumadla se uchovávají oddělené od léčivých a pomocných látek.

V označení na obalu zkoumadel (pevně lpící štítek nebo označení přímo na obalu) se uvede název zkoumadla, u roztoků také koncentrace, datum přípravy a údaj, kdo roztok připravil. Zkoumadla připravovaná a vydávaná v lékárnách nebo v laboratořích zdravotnických zařízení se označují žlutými štítky s černým nápisem, v němž je uvedeno:

a) přesné označení lékárny (zdravotnického zařízení),
b) datum přípravy zkoumadla a jméno (zkratka) osoby, která zkoumadlo připravila,
c) přesný název při předpisu "Signa suo nomine" a složení při předpisu "Signa cum formula",
d) je-li zkoumadlo omamná látka, zvláště nebezpečný jed, žíravina, hořlavina, uvede se v označení příslušný symbol.

4.1.1 Zkoumadla

Acetaldehyd R

C_2H_4O M_r 44,1 CAS 75-07-0

Ethanal

Čirá bezbarvá těkavá snadno zápalná kapalina, mísitelná s vodou a lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,788.
n_D^{20}: asi 1,332.
TV: asi 21 °C.

Acetanhydrid R

$C_4H_6O_3$ M_r 102,1 CAS 108-24-7

Anhydrid kyseliny octové

Obsahuje nejméně 97,0 % $C_4H_6O_3$. Čirá bezbarvá kapalina.

TV: 136 °C až 142 °C.

Stanovení obsahu. 2,00 g se rozpustí v 50,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* v baňce se zabroušenou zátkou a vaří se 1 h pod zpětným chladičem. Potom se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS*, titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* a vypočítá se počet ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* spotřebovaného na 1 g látky (n_1).

2,00 g se rozpustí v 20 ml *cyklohexanu R* v baňce se zabroušenou zátkou. K tomuto roztoku se za chlazení v ledové lázni přidá 10 ml *anilinu R* a 20 ml *cyklohexanu R*. Směs se vaří 1 h pod zpětným chladičem, přidá se 50,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a silně se protřepe. Přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* a vypočítá se počet ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* na 1 g látky (n_2).

Obsah $C_4H_6O_3$ v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$10{,}2\ (n_1 - n_2)\ .$$

Acetanhydrid v kyselině sírové RS

5 ml *acetanhydridu R* se opatrně smíchá s 5 ml *kyseliny sírové R*. Po kapkách a za stálého chlazení se přidá 50 ml *ethanolu R*. Roztok je bezbarvý.

Připravuje se těsně před použitím.

Acetanhydrid RS1

Acetylační směs

25,0 ml *acetanhydridu R* se rozpustí v *pyridinu bezvodém R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Uchovává se chráněn před světlem a vzduchem.

Acetonitril R

C_2H_3N M_r 41,05 CAS 75-05-8

Methylkyanid

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s acetonem, s etherem a s methanolem. Roztok (100 g/l) je neutrální na lakmusový papír.

$\boldsymbol{d_{20}^{20}}$: asi 0,78.

$\boldsymbol{n_D^{20}}$: asi 1,344.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 80 °C až 82 °C.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 98 % při 225 nm až 420 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Acetonitril pro chromatografii R

Vyhovuje požadavkům předepsaným pro *acetonitril R* a následujícím dodatečným požadavkům:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 98 % při 240 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Stanovení obsahu (*2.2.28*). Nejméně 99,8 %.

Aceton R

Viz článek *Acetonum*.

Acetylaceton R

$C_5H_8O_2$ M_r 100,1 CAS 123-54-6

2,4-Pentandion

Bezbarvá nebo slabě nažloutlá, snadno zápalná kapalina, snadno rozpustná ve vodě, mísitelná s acetonem, lihem 96%, s etherem a s kyselinou octovou ledovou.

n_D^{20}: 1,452 až 1,453.

TV: 138 °C až 140 °C.

Acetylaceton RS1

Ke 100 ml *octanu amonného RS* se přidá 0,2 ml *acetylacetonu R*.

Acetyleugenol R

$C_{12}H_{14}O_3$ M_r 206,2 CAS 93-28-7

2-Methoxy-4-(2-propenyl)fenylacetat

Žlutě zbarvená olejovitá kapalina, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru, prakticky nerozpustná ve vodě.

n_D^{20}: asi 1,521.

TV: 281 °C až 282 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*), jak je předepsáno v článku *Caryophylli etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Acetylchlorid R

C_2H_3ClO M_r 78,5 CAS 75-36-5

Čirá, bezbarvá, zápalná kapalina, působením vody a lihu 96% se rozkládá, mísitelná s dichlorethanem.

d_{20}^{20}: asi 1,10.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 49 °C až 53 °C.

Acetylcholiniumchlorid R

$C_7H_{16}ClNO_2$ M_r 181,7 CAS 60-31-1

Krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve studené vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru; rozkládá se v horké vodě a v alkáliích.

Uchovává se při -20 °C.

N-Acetyltryptofan R

$C_{13}H_{14}N_2O_3$ M_r 246,3 CAS 87-32-1

Kyselina 2-acetylamino-3-(3-indolyl)propanová

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

TT: asi 205 °C.

Stanovení obsahu. 10,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 90) a zředí se jí na 100,0 ml. Stanoví se, jak je uvedeno v článku *Tryptophanum,* ve zkoušce 1,1′-Ethylidenbistryptofan a jiné příbuzné látky.

Plocha hlavního píku na chromatogramu je nejméně 99,0 % plochy všech píků.

Zředí se *vodou R* na 50,0 ml (2 µg/ml).

Acetyltyrosinethylester R

$C_{13}H_{17}NO_4 . H_2O$ M_r 269,3 CAS 36546-50-6

Monohydrát N-acetyl-L-tyrosinethylesteru; monohydrát ethyl-(*S*)-2-acetamido-3-(4-hydroxyfenyl)-propionatu

Bílý krystalický prášek, vhodný ke stanovení obsahu chymotrypsinu.

$[\alpha]_D^{20}$: +21° až +25°; měří se roztok 10,0 g/l v *lihu 96% R.*

$A_{1cm}^{1\%}$: 60 až 68; měří se při 278 nm v *lihu 96% R.*

Acetyltyrosinethylester 0,2 mol/l RS

0,54 g *acetyltyrosinethylesteru R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Adenosin R

$C_{10}H_{13}N_5O_4$ M_r 267,2 CAS 58-61-7

6-Amino-9-β-D-ribofuranosyl-9*H*-purin

Bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu, v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin.

TT: asi 234 °C.

Agarosa-DEAE pro výměnnou iontovou chromatografii R

CAS 57407-08-6

Příčně síťovaná agarosa substituovaná dimethylaminoethylovými skupinami, ve formě kuliček.

Agarosa pro elektroforézu R

CAS 9012-36-6

Neutrální lineární polysacharid, jehož hlavní podíl je odvozen od agaru.

Bílý až téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustná ve studené vodě, velmi těžce rozpustná v horké vodě.

Agarosa pro chromatografii R

CAS 9012-36-6

Jsou to nabobtnalé kuličky o průměru 60 µm až 140 µm ve formě 4% suspenze ve *vodě R*. Používá se k dělení bílkovin s M_r 6 . 10^4 až 20 . 10^6 a k dělení polysacharidů s M_r 3 . 10^3 až 5 . 10^6 metodou vylučovací chromatografie.

Agarosa síťovaná pro chromatografii R

CAS 61970-08-9

Připravuje se z agarosy reakcí s 2,3-dibrompropanolem v silně alkalickém prostředí.

Je dodávána jako nabobtnalé kuličky o průměru 60 µm až 140 µm ve formě 4% suspenze v *vodě R*. Používá se k dělení bílkovin s M_r 6 . 10^4 až 20 . 10^6 a k dělení polysacharidů s M_r 3 . 10^3 až 5 . 10^6 metodou vylučovací chromatografie.

Agarosa síťovaná pro chromatografii R1

CAS 65099-79-8

Připravuje se z agarosy reakcí s 2,3-dibrompropanolem v silně alkalickém prostředí. Je dodávána jako nabobtnalé kuličky o průměru 60 μm až 140 μm ve formě 4% suspenze ve *vodě R*. Používá se k dělení bílkovin s M_r 7 . 10^4 až 40 . 10^6 a polysacharidů s M_r 1 . 10^5 až 2 . 10^7 metodou vylučovací chromatografie.

Agarosa síťovaná polyakrylamidem R

Je to agarosa příčně síťovaná polyakrylamidem; je vhodná pro dělení globulinů s M_r 2 . 10^4 až 35 . 10^4.

Akonitin R

$C_{34}H_{47}NO_{11}$ M_r 645,8 CAS 302-27-2

Bezbarvé krystaly nebo bílý až slabě nažloutlý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a etheru.
TT: 200 °C až 205 °C, za rozkladu.

Akrylamid R

C_3H_5NO M_r 71,1 CAS 79-06-1

Propenamid

Bezbarvé nebo bílé vločky nebo bílý až téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, snadno rozpustný v ethanolu.
TT: asi 84 °C.

Aktivní uhlí R

Viz článek *Carbo activatus*.

ß-Alanin R

$C_3H_7NO_2$ M_r 89,1 CAS 107-95-9

Kyselina 3-aminopropionová

Obsahuje nejméně 99,0 % $C_3H_7NO_2$.

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru.
TT: asi 200 °C, za rozkladu.

Albumin hovězí R

CAS 9048-46-8

Obsahuje asi 96 % bílkovin. Bílý až světle žlutavě hnědý prášek.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 0,800 g zkoušené látky.

Albumin hovězí použitý ke stanovení účinnosti tetrakosaktidu je prostý pyrogenních látek, bez proteolytické aktivity přezkoušené vhodnou metodou, např. za použití chromogeního substrátu a bez kortikosteroidní aktivity stanovené měřením fluorescence popsaným ve stanovení účinnosti v článku *Tetracosactidum*.

Albumin lidský RS

Viz článek *Albumini humani solutio.*

Albumin lidský RS1

Albumin lidský RS se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci bílkoviny 1 g/l. Hodnota pH tohoto roztoku se upraví pomocí *kyseliny octové ledové R* na 3,5 až 4,5.

Alizarin S R

$C_{14}H_7NaO_7S \cdot H_2O$ M_r 360,3 CAS 130-22-3

Colour Index 58005, Schultz 1145

Sodná sůl kyseliny 3,4-dihydroxy-2-antrachinonsulfonové monohydrát

Oranžově žlutý prášek, snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Alizarin S RS

Roztok 1 g/l.

Zkouška citlivosti. Zkouší se roztok za podmínek uvedených u *chloristanu barnatého 0,05 mol/l VS (4.2.2.)*; žluté zbarvení se změní na oranžově červené.

Barevný přechod. pH 3,7 až pH 5,2; ze žlutého zbarvení na fialové.

Allylisothiokyanat R

C_4H_5NS M_r 99,2 CAS 57-06-7

Bezbarvá čirá kapalina, silně dráždící, těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 1,015.

TV: 148 °C až 154 °C.

Aloin R

$C_{21}H_{22}O_9 \cdot H_2O$ M_r 436,4 CAS 1415-73-2

Barbaloin

10-(β-D-Glukopyranosyl)-1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)anthron monohydrát

Žluté jehličky nebo žlutý až tmavě žlutý krystalický prášek, na vzduchu a na světle tmavnoucí. Je mírně rozpustný ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustný v acetonu, roztocích alkalických hydroxidů a amoniaku a velmi těžce rozpustný v etheru.

$A_{1cm}^{1\%}$: asi 192 při 269 nm, asi 226 při 296,5 nm, asi 259 při 354 nm, počítáno na bezvodou látku; měří se roztoky v *methanolu R.*

Chromatografie. Látka se zkouší za stejných podmínek a ve stejné koncentraci, jako je uvedeno v článku *Frangulae cortex.* Na chromatogramu je pouze jedna hlavní skvrna.

Amidosíran amonný R

$NH_2SO_3NH_4$ M_r 114,1 CAS 7773-06-0

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 130 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Aminoazobenzen R

$C_{12}H_{11}N_3$ M_r 197,2 CAS 60-09-3

Colour Index 11000

4-Aminoazobenzen

Hnědožluté jehličky s modravým leskem. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 128 °C.

Aminobutanol R

$C_4H_{11}NO$ M_r 89,1 CAS 5856-63-3

(*R*)-2-Amino-1-butanol

Olejovitá kapalina, mísitelná s vodou, dobře rozpustná v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,94.

n_D^{20}: asi 1,453.

TV: asi 180 °C.

4-Aminofenol R

C_6H_7NO M_r 109,1 CAS 123-30-8

Bílý nebo slabě zbarvený krystalický prášek, vlivem světla a vzduchu tmavne. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu.

TT: asi 186 °C, za rozkladu.

Uchovává se chráněn před světlem.

Aminochlorbenzofenon R

$C_{13}H_{10}ClNO$ M_r 231,7 CAS 719-59-5

2-Amino-5-chlorbenzofenon

Žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 97 °C.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek popsaných v článku *Chlordiazepoxidi hydrochloridum*. Nanáší se 5 μl roztoku 0,5 g/l v *methanolu R*. Na chromatogramu je pouze jedna hlavní skvrna, R_F asi 0,9.

Uchovává se chráněn před světlem.

Aminonitrobenzofenon R

$C_{13}H_{10}N_2O_3$ M_r 242,2 CAS 1775-95-7

2-Amino-5-nitrobenzofenon

Žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v tetrahydrofuranu, těžce rozpustný v methanolu.

$A_{1cm}^{1\%}$: 690 až 720 při 233 nm; měří se roztok 0,010 g/l v *methanolu R*.

TT: asi 160 °C.

3-Aminopropanol R

C_3H_9NO M_r 75,1 CAS 156-87-6

3-Amino-1-propanol

Čirá bezbarvá viskózní kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,99.

n_D^{20}: asi 1,461.

TT: asi 11 °C.

Aminopyrazolon R

$C_{11}H_{13}N_3O$ M_r 203,2 CAS 83-07-8

4-Amino-1-fenyl-2,3-dimethyl-5-pyrazolon; 4-aminoantipyrin

Světle žluté jehličky nebo prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

TT: asi 108 °C.

Aminopyrazolon RS

Roztok 1 g/l v *tlumivém roztoku o pH 9,0.*

Amoniak 32% R

NH_3 M_r 17,03 CAS 7664-41-7

Obsahuje nejméně 32,0 % NH_3. Čirá bezbarvá kapalina.

d_{20}^{20}: 0,883 až 0,889.

Stanovení obsahu. Skleněná baňka se zabroušenou zátkou se přesně zváží s 50,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*, přidají se 2 ml zkoušené látky a znovu se zváží. Titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS.*

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 17,03 mg NH_3.

Uchovává se chráněn před atmosférickým oxidem uhličitým při teplotě pod 20 °C.

Amoniak 26% R

Viz článek *Ammoniae solutio concentrata.*

Amoniak 17,5% RS

Obsahuje 170 g/l až 180 g/l NH_3 (M_r 17,03).

Příprava. 67,0 g *amoniaku 26% R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

d_{20}^{20}: 0,931 až 0,934.

Jestliže se použije pro limitní zkoušku na železo, vyhovuje následující dodatečné zkoušce: 5 ml se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 10 ml *vody R.* Po přidání 2 ml roztoku *kyseliny citronové R* (200 g/l) a 0,1 ml *kyseliny thioglykolové R* se roztok zalkalizuje *amoniakem 17,5% RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml; nevzniká žádné růžové zbarvení.

Uchovává se chráněn před atmosférickým oxidem uhličitým a při teplotě nižší než 20 °C.

Amoniak zředěný RS1

Obsahuje 100 g/l až 104 g/l NH_3 (M_r 17,03).

Příprava. 41 g *amoniaku 26% R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Amoniak zředěný RS2

Obsahuje 33 g/l až 35 g/l NH_3 (M_r 17,03).
Příprava. 14 g *amoniaku 26% R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

α-Amylasa R

1,4-α-D-glukan-glukanohydrolasa (EC *3.2.1.1*)
Bílý až světle hnědý prášek.

α-Amylasa RS

Roztok *α-amylasy R* s účinností 800 FAU/g.

Amylen R

C_5H_{10} M_r 70,1 CAS 513-35-9

2-Methyl-2-buten
Velmi hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.
TV: 37,5 °C až 38 °C.

Anethol R

$C_{10}H_{12}O$ M_r 148,2 CAS 104-46-1

1-Methoxy-4-(1-propenyl)benzen
Bílá krystalická hmota do 20 °C až 21 °C, nad 23 °C kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu, dobře v etheru, v ethylacetatu a etheru petrolejovém.
n_D^{25}: asi 1,56.
TV: asi 230 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Anisi etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.
Plocha hlavního píku odpovídající *trans*-anetholu je nejméně 99,0 % z celkové plochy píků.

cis-Anethol R

$C_{10}H_{12}O$ M_r 148,2

(*Z*)-1-Methoxy-4-(1-propenyl)benzen
Bílá krystalická hmota do 20 °C až 21 °C, nad 23 °C kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu, dobře rozpustný v etheru, ethylacetatu a v etheru petrolejovém.
n_D^{25}: asi 1,56.
TV: asi 230 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Anisi etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.
Plocha hlavního píku je nejméně 92,0 % z celkové plochy píků.

Anex R

Je to iontoměnič v Cl^- cyklu obsahující kvarter ní amoniové skupiny [$-CH_2N^+(CH_3)_3$] navázané na polymerní mřížku z polystyrenu zesíťovaného s 2 % divinylbenzenu. Vyrábí se ve formě kuliček, jejichž průměr je uveden za názvem zkoumadla ve zkouškách, kde je použit.

Iontoměnič se promývá na skleněném filtru *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* až do negativní reakce na chloridy v eluátu. Potom se promývá *vodou R* až do neutrální reakce.

Čerstvě suspendovaný iontoměnič ve *vodě prosté amoniaku R* se uchovává chráněn před atmosférickým oxidem uhličitým.

Anex silně zásaditý R

Pryskyřice gelového typu v OH^- cyklu obsahující kvarterní amoniové skupiny [$-CH_2N^+(CH_3)_3$, typ 1] navázané na polymerní mřížku z polystyrenu zesíťovaného s 8 % divinylbenzenu.

Hnědé průhledné kuličky.

Velikost částic. 0,2 až 1,0 mm.

Obsah vlhkosti. Asi 50 %.

Celková výměnná kapacita. Nejméně 1,2 mekv/ml.

Anhydrid kyseliny maleinové R

$C_4H_2O_3$ M_r 98,1 CAS 108-31-6

2,5-Furandion

Bílé krystalky, dobře rozpustné ve vodě za tvorby kyseliny maleinové, velmi snadno rozpustné v acetonu a v ethylacetatu, snadno rozpustné v toluenu, dobře rozpustné v lihu 96% za tvorby esterů, velmi těžce rozpustné v etheru petrolejovém.

TT: asi 52 °C.

Zbytky nerozpustné v toluenu. Nejvýše 5 % (kyselina maleinová).

Anhydrid kyseliny maleinové RS

5 g *anhydridu kyseliny maleinové R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 100 ml. Roztok je použitelný jeden měsíc. Pokud je roztok zakalen, zfiltruje se.

Anhydrid kyseliny propionové R

$C_6H_{10}O_3$ M_r 130,1 CAS 123-62-6

Čirá bezbarvá kapalina, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 1,01.

TV: asi 167 °C.

Anilin R

C_6H_7N M_r 93,1 CAS 62-53-3

Aminobenzen

Bezbarvá až slabě nažloutlá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,02.

TV: 183 °C až 186 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Anisaldehyd R

$C_8H_8O_2$ M_r 136,1 CAS 123-11-5

4-Methoxybenzaldehyd

Olejovitá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

TV: asi 248 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Anisi etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 99,0 % z celkové plochy píků.

Anisaldehyd RS

V následujícím pořadí se smíchá 0,5 ml *anisaldehydu R*, 10 ml *kyseliny octové ledové R*, 85 ml *methanolu R* a 5 ml *kyseliny sírové R*.

Anisaldehyd RS1

K 10 ml *anisaldehydu R* se přidá 90 ml *lihu 96% R*, zamíchá se, přidá se 10 ml *kyseliny sírové R* a opět se zamíchá.

Anthracen R

$C_{14}H_{10}$ M_r 178,2 CAS 120-12-7

Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v chloroformu.

TT: asi 218 °C.

Anthron R

$C_{14}H_{10}O$ M_r 194,2 CAS 90-44-8

Anthracen-9(10*H*)-on

Světle žlutý krystalický prášek.

TT: asi 155 °C.

Antisérum vztekliny konjugované s fluoresceinem R

Imunoglobulinová frakce s vysokým protilátkovým titrem vztekliny připravená ze séra vhodných zvířat, která byla imunizována inaktivovaným virem vztekliny. Imunoglobulin se konjuguje s isothiokyanatofluoresceinem.

Antitrombin III R

CAS 90170-80-2

Specifická účinnost je nejméně 6 m.j. v miligramu.

Je to frakce lidské krevní plazmy přečištěná heparin-agarosovou chromatografií.

Antitrombin III RS1

Antitrombin III R se rozředí podle návodu výrobce a zředí se *tlumivým roztokem trometamolovým s chloridem sodným o pH 7,4* tak, aby 1 ml obsahoval 1 m.j.

Antitrombin III RS2

Antitrombin III R se rozředí podle návodu výrobce a zředí se *tlumivým roztokem trometamolovým s chloridem sodným o pH 7,4* tak, aby 1 ml obsahoval 0,5 m.j.

Apigenin R

$C_{15}H_{10}O_5$ M_r 270,2 CAS 520-36-5

4′,5,7-Trihydroxyflavon

Světlý nažloutlý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 310 °C, za rozkladu.

Chromatografie. Zkouší se postupem předepsaným v článku *Chamomillae romanae flos.* Nanáší se 10 µl roztoku 0,25 g/l v *methanolu R.*

Chromatogram vykazuje v horní třetině hlavní skvrnu se žlutozelenou fluorescencí.

Apigenin-7-glukosid R

$C_{21}H_{20}O_{10}$ M_r 432,6

Světlý nažloutlý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

TT: 198 °C až 201 °C.

Chromatografie. Zkouší se postupem předepsaným v článku *Chamomillae romanae flos.* Nanáší se 10 µl roztoku 0,25 g/l v *methanolu R.*

Chromatogram vykazuje ve střední třetině hlavní skvrnu se žlutou fluorescencí.

Aprotinin R

Viz článek *Aprotininum.*

Arabinosa R

$C_5H_{10}O_5$ M_r 150,1 CAS 87-72-9

L-(+)-Arabinosa; β-L-arabinopyranosa

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě.

$[\alpha]_D^{20}$: +103° až +105°; měří se roztok 50 g/l ve *vodě R* obsahující asi 0,05 % NH_3.

Arabská klovatina R

Viz článek *Acaciae gummi.*

Arabská klovatina RS

100 g *arabské klovatiny R* se rozpustí v 1000 ml *vody R,* míchá se pomocí mechanického míchadla 2 h a odstřeďuje se při asi 2000 g_n 30 min, dokud roztok není čirý.

Uchovává se v polyethylenových obalech o obsahu asi 250 ml při 0 °C až -20 °C.

Arbutin R

$C_{12}H_{16}O_7$ M_r 272,3 CAS 497-76-7

Arbutosid; 4-hydroxyfenyl-ß-D-glukopyranosid

Jemné, bílé, lesklé jehličky. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi dobře rozpustný v horké vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.
$[\alpha]_D^{20}$: asi -64°; měří se roztok (20 g/l).
TT: asi 200 °C.

Chromatografie. Zkouší se postupem uvedeným v článku *Uvae ursi folium*; na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Argon R

Ar A_r 39,95 CAS 7440-37-1

Obsahuje nejméně 99,995 % (*V/V*) Ar.

Oxid uhelnatý. 10 l *argonu R* se při průtoku 4 l/h zkouší na CO za podmínek uvedených ve stati *(2.5.25, Metoda I)*. Spotřebuje se nejvýše 0,05 ml *thiosíranu sodného 0,002 mol/l VS* (0,6 ml/m^3).

Arsenitan sodný RS

0,50 g *oxidu arsenitého R* se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidají se 2,0 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Askorban sodný RS

CAS 134-03-2

3,5 g *kyseliny askorbové R* se rozpustí ve 20 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS.* Připraví se v čas potřeby.

L-Aspartyl-L-fenylalanin R

$C_{13}H_{16}N_2O_5$ M_r 280,3 CAS 13433-09-5

Kyselina (*S*)-3-amino-N-[(*S*)-2-fenylethyl-1-karboxy]jantarová
Bílý prášek.
TT: asi 210 °C, za rozkladu.

Azid sodný R

NaN_3 M_r 65,0 CAS 26628-22-8

Bílý krystalický prášek nebo krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Azomethin H R

$C_{17}H_{12}NNaO_8S_2$ M_r 445,4 CAS 5941-07-1

Monosodná sůl kyseliny 4-hydroxy-5-(2-hydroxybenzylidenamino)-2,7-naftalendisulfonové

Azomethin H RS

0,45 g *azomethinu H R* a 1,0 g *kyseliny askorbové R* se rozpustí za mírného zahřívání ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Barbital R

Viz článek *Barbitalum.*

Barbital sodná sůl R

$C_8H_{11}N_2NaO_3$ M_r 206,2 CAS 144-02-5

Sodná sůl kyseliny 5,5-diethylbarbiturové

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_8H_{11}N_2NaO_3$.

Bezbarvé krystalky nebo bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Benzaldehyd R

C_7H_6O M_r 106,1 CAS 100-52-7

Bezbarvá nebo slabě žlutá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,05.

n_D^{20}: asi 1,545.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 177 °C až 180 °C.

Benzen R

C_6H_6 M_r 78,1 CAS 71-43-2

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

TV: asi 80 °C.

Benzethoniumchlorid R

$C_{27}H_{42}ClNO_2 \cdot H_2O$ M_r 466,1 CAS 121-54-0

Benzyl-dimethyl-(2-{2-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenoxy]ethoxyethyl})amoniumchloridmonohydrát

Jemný bílý prášek nebo bezbarvé krystalky. Je dobře rozpustný ve vodě, v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

TT: asi 163 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Benzofenon R

$C_{13}H_{10}O$ M_r 182,2 CAS 119-61-9

Difenylmethanon

Hranolovité krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a etheru.

TT: asi 48 °C.

Benzoin R

$C_{14}H_{12}O_2$ M_r 212,3 CAS 579-44-2

2-Hydroxy-1,2-difenylethanon

Slabě žluté krystalky, velmi těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v acetonu, dobře rozpustné v horkém lihu 96%, mírně rozpustné v etheru.

TT: asi 137 °C.

Benzoylargininethylesterhydrochlorid R

$C_{15}H_{23}ClN_4O_3$ M_r 342,8 CAS 2645-08-1

(*S*)-1-[4-(ethoxykarbonyl)-4-(benzamido)butyl]guanidiniumchlorid

Bílý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě a ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

$[\alpha]_D^{20}$: -15° až -18°, měří se roztok 10,0 g/l.

$A_{1cm}^{1\%}$: 310 až 340, měří se roztok 0,010 g/l při 227 nm.

TT: asi 129 °C.

Benzoylchlorid R

C_7H_5ClO M_r 140,6 CAS 98-88-4

Bezbarvá, k slzám dráždící kapalina, dobře rozpustná v etheru, rozkládá se vodou a lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 1,21.

TV: asi 197 °C.

N-Benzoyl-L-prolyl-L-fenylalanyl-L-arginyl-N-(4-nitrofenyl)amoniumacetat R

$C_{35}H_{42}N_8O_8$ M_r 703

Benzylalkohol R

Viz článek *Alcohol benzylicus.*

Benzylbenzoat R

Viz článek *Benzylis benzoas.*

Chromatografie. Zkouší se za podmínek popsaných v článku *Balsamum peruvianum*. Nanáší se 20 μl roztoku 0,3% *(V/V)* v *ethylacetatu R.* Po postřiku a zahřátí je na chromatogramu patrná hlavní skvrna o R_F asi 0,8.

Benzylcinnamat R

$C_{16}H_{14}O_2$ M_r 238,3 CAS 103-41-3

Benzylester kyseliny skořicové

Bezbarvé nebo nažloutlé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TV: asi 39 °C.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek popsaných v článku *Balsamum peruvianum.* Nanáší se 20 µl roztoku (3 g/l) v *ethylacetatu R.* Po postřiku a zahřátí je na chromatogramu patrná hlavní skvrna o R_F asi 0,6.

Benzylpenicilin sodná sůl R

Viz článek *Benzylpenicillinum natricum.*

Bergapten R

$C_{12}H_8O_4$ M_r 216,2 CAS 484-20-8

5-Methoxypsoralen; 4-methoxyfuro[3,2-*g*]-benzopyranon

Bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a těžce rozpustný v kyselině octové ledové.
TT: asi 188 °C.

Betulin R
$C_{30}H_{50}O_2$ M_r 442,7 CAS 473-98-3

Lup-20(39)-en-3β,28-diol
Bílý krystalický prášek.
TT: 248 °C až 251 °C.

Bibenzyl R
$C_{14}H_{14}$ M_r 182,3 CAS 103-29-7

1,2-Difenylethan
Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v lihu 96%.
TT: 50 °C až 53 °C.

4-Bifenylol R
$C_{12}H_{10}O$ M_r 170,2 CAS 90-43-7

4-Fenylfenol
Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě.
TT: 164 °C až 167 °C.

Bis(2-ethylhexyl)ftalat
$C_{24}H_{38}O_4$ M_r 390,5 CAS 117-81-7

Bezbarvá olejovitá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v organických rozpouštědlech.
d_{20}^{20}: asi 0,98.
n_D^{20}: asi 1,486.
Viskozita (2.2.9). Asi 80 mPa.s (80 cP).

Bismutičnan sodný R
$NaBiO_3$ M_r 280,0 CAS 12232-99-4

Obsahuje nejméně 85,0 % $NaBiO_3$. Žlutý až žlutavě hnědý prášek, který se za vlhka a při zvýšených teplotách pomalu rozkládá, prakticky nerozpustný ve studené vodě.

Stanovení obsahu. 0,200 g se suspenduje v 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l) a přidá se 20 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za přítomnosti 1 ml *škrobu RS* až do oranžového zbarvení.
1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,00 mg $NaBiO_3$.

N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid R
$C_8H_{21}NOSi_2$ M_r 203,4 CAS 10416-59-8

Bezbarvá kapalina.
d_{20}^{20}: asi 0,83.

Biuret R

$C_2H_5N_3O_2$ M_r 103,1 CAS 108-19-0

Karbamoylmočovina

Bílé hygroskopické krystalky, dobře rozpustné ve vodě, mírně rozpustné v lihu 96%, velmi těžce rozpustné v etheru.

TT: 188 °C až 190 °C, za rozkladu.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Borneol R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,3 CAS 507-70-0

endo-2-Bornanol; *endo*-1,7,7-trimethylbicyklo[2,2,1]heptan-2-ol

Bezbarvé krystaly, snadno sublimující. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, v etheru a etheru petrolejovém.

TT: asi 208 °C

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*. Na vrstvu *silikagelu G R* se nanese 10 μl roztoku 1 g/l v *toluenu R* a vyvíjí se *chloroformem R* po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* (10 ml pro desku 200 mm x 200 mm) a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu je pouze jedna hlavní skvrna.

Bornylacetat R

$C_{12}H_{20}O_2$ M_r 196,3 CAS 5655-61-8

endo-2-Bornylacetat

Bezbarvé krystaly nebo bezbarvá kapalina. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 28 °C.

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*. Na vrstvu *silikagelu G R* se nanese 10 μl roztoku 2 g/l v *toluenu R* a vyvíjí se *chloroformem R* po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* (10 ml pro desku 200 mm x 200 mm) a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu je pouze jedna skvrna.

Bromelin R

CAS 37189-34-7

Koncentrát proteolytických enzymů získaný z *Ananas comosus* Merr. Nevýrazně žlutý prášek.

Účinnost. 1,0 g látky uvolní v průběhu 20 min asi 1,2 g dusíku aminoskupiny z roztoku *želatiny R* při 45 °C a pH 4,5.

Bromelin RS

Roztok *bromelinu R* 10 g/l ve směsi objemových dílů *fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 5,5* a roztoku *chloridu sodného R* 9 g/l.

Bromičnan draselný R

$KBrO_3$ M_r 167,0 CAS 7758-01-3

Bílý zrnitý prášek nebo krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Bromid draselný R

Viz článek *Kalii bromidum.*

Při použití pro infračervenou absorpční spektrofotometrii (2.2.24) vyhovuje následujícímu požadavku: 2 mm silný výlisek látky sušený 1 h při 250 °C má téměř rovnou základní linii v oblasti při 4000 cm^{-1} až 620 cm^{-1}. Nevykazuje žádné maximum absorpce vyšší než 0,02 nad touto linií s výjimkou maxima při 3440 cm^{-1} a 1630 cm^{-1} (voda).

Bromid jodný R

IBr M_r 206,8 CAS 7789-33-5

Modročerné až hnědočerné krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96%, v etheru a v kyselině octové ledové.
TV: asi 116 °C.
TT: asi 40 °C.
Uchovává se v chladu, chráněn před světlem.

Bromid jodný RS

20 g *bromidu jodného R* se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 1000 ml.
Uchovává se chráněn před světlem.

Bromid rtuťnatý R

$HgBr_2$ M_r 360,4 CAS 7789-47-1

Bílé nebo slabě žluté krystalky nebo krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Bromkyan RS

K *bromové vodě R* se přidává po kapkách za chlazení roztok *thiokyanatanu amonného 0,1 mol/l VS*, dokud nezmizí žlutá barva. Připravuje se v čas potřeby.

Bromnan sodný RS

Za chlazení v ledové lázni se smíchá 20 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 500 ml *vody R*, přidá se 5 ml *bromu RS* a pomalu se míchá do rozpuštění.
Připravuje se v čas potřeby.

Bromová voda R

3 ml *bromu R* se třepou se 100 ml *vody R* do nasycení.
Uchovává se nad přebytkem *bromu R* chráněna před světlem.

Bromová voda R1

0,5 ml *bromu R* se třepe se 100 ml *vody R*.
Uchovává se chráněna před světlem a je použitelná nejdéle 1 týden.

5-Brom-2′-deoxyuridin R

$C_9H_{11}BrN_2O_5$ M_r 307,1 CAS 59-14-3

5-Brom-1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-1*H*,3*H*-pyrimidin-2,4-dion
TT: asi 194 °C.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Idoxuridinum*; nanáší se 5 μl roztoku 0,25 g/l. Získaný chromatogram vykazuje jenom jednu hlavní skvrnu.

Brom R

Br_2 M_r 159,8 CAS 7726-95-6

Hnědočervená dýmající kapalina, těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru.
d_{20}^{20}: asi 3,1.

Brom RS

30 g *bromu R* a 30 g *bromidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.
Uchovává se chráněn před světlem.

Brucin R

$C_{23}H_{26}N_2O_4 \cdot 2H_2O$ M_r 430,5 CAS 357-57-3

10,11-Dimethoxystrychnin dihydrát
Bezbarvé krystaly, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a v etheru.
TT: asi 178 °C.

1-Butanol R

$C_4H_{10}O$ M_r 74,1 CAS 71-36-3

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s lihem 96%.
d_{20}^{20}: asi 0,81.
TV: 116 °C až 119 °C.

2-Butanol R1

$C_4H_{10}O$ M_r 74,1 CAS 78-92-2

Sek.butanol
Obsahuje nejméně 99,0 % $C_4H_{10}O$. Čirá bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,81.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 99 °C až 100 °C.

Stanovení obsahu. Stanoví se plynovou chromatografií za podmínek popsáných v článku *Alcohol isopropylicus.*

2-Butanon R

C_4H_8O M_r 72,1 CAS 78-93-3

Ethylmethylketon
Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, velmi snadno rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96 % a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,81.
TV: 79 °C až 80 °C.

Butylacetat R

$C_6H_{12}O_2$ M_r 116,2 CAS 123-86-4

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,88.
n_D^{20}: asi 1,395.
Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 123 °C až 126 °C.

Butylacetat R1

$C_6H_{12}O_2$ M_r 116,2

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,883.
n_D^{20}: asi 1,395.
1-Butanol. Nejvýše 0,2 %, stanoví se plynovou chromatografií.
N-butylformiat. Nejvýše 0,1 %, stanoví se plynovou chromatografií.
N-butylpropionat. Nejvýše 0,1 %, stanoví se plynovou chromatografií.
Voda. Nejvýše 0,1 %.
Stanovení obsahu. Nejméně 99,5 % $C_6H_{12}O_2$, stanoví se plynovou chromatografií.

Butylamin R

$C_4H_{11}N$ M_r 73,1 CAS 109-73-9

1-Aminobutan
Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s lihem 96% a s etherem.
n_D^{20}: asi 1,401.
TV: asi 78 °C.
Předestilovaný se používá nejvýše 1 měsíc.

Butylhydroxytoluen R

Viz článek *Butylhydroxytoluenum*.

Cefaëlindihydrochlorid R

$C_{28}H_{40}Cl_2N_2O_4 \cdot 7H_2O$ M_r 666 CAS 5884-43-5

7′,10,11-Trimethoxy-6′-emetanol-dihydrochlorid heptahydrát
Bílý až nažloutlý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%.
$[\alpha]_D^{20}$: asi +25°; měří se roztok 20 g/l.

Celulosa pro chromatografii R

CAS 9004-34-6

Jemný bílý homogenní prášek o průměrné velikosti částic menší než 30 μm.

Příprava tenké vrstvy. 15 g se suspenduje ve 100 ml *vody R,* homogenizuje se 60 s v elektrickém mixéru a pečlivě a čistě se nanese vrstva o síle 0,1 mm na desky za použití nanášecího zařízení. Suší se na vzduchu.

Celulosa pro chromatografii R1

Mikrokrystalická celulosa. Jemný bílý homogenní prášek o průměrné velikosti částic menší než 30 μm.

Příprava tenké vrstvy. 25 g se suspenduje v 90 ml *vody R,* homogenizuje se 60 s v elektrickém mixéru a pečlivě a čistě se nanese vrstva o síle 0,1 mm na desky za použití nanášecího zařízení. Suší se na vzduchu.

Celulosa pro chromatografii F_{254} R

Mikrokrystalická celulosa F_{254}. Jemný bílý homogenní prášek o průměrné velikosit částic menší než 30 μm s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Příprava tenké vrstvy. 25 g se suspenduje ve 100 ml *vody R,* homogenizuje se 60 s v elektrickém mixéru a pečlivě a čistě se nanese vrstva o síle 0,1 mm na desky za použití nanášecího zařízení. Suší se na vzduchu.

Cetrimid R

Viz článek *Cetrimidum.*

Cetrimoniumbromid R

$C_{19}H_{42}BrN$ M_r 364,5 CAS 57-09-0

Hexadecyltrimethylamoniumbromid

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 240 °C.

Cetylstearylalkohol R

Viz článek *Alcohol cetylicus et stearylicus.*

Cetylstearylsíran sodný R

Viz článek *Natrii cetylo- et stearylosulfas.*

Cineol R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,3 CAS 470-82-6

Eukalyptol; 1,8-epoxy-*p*-menthan

Bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a s etherem.

d_{20}^{20}: 0,922 až 0,927.

n_D^{20}: 1,456 až 1,459.

Teplota tuhnutí (2.2.18). 0 °C až 1 °C.

Destilační rozmezí (2.2.11). 174 °C až 177 °C.

Fenol. 1,0 g se třepe s 20 ml *vody R*. Po oddělení vrstev se k 10 ml vodné vrstvy přidá 0,1 ml *chloridu železitého RS1*; nevznikne žádné fialové zbarvení.

Terpentýnový olej. 1,0 g se rozpustí v 5 ml roztoku *lihu R* 90% (*V/V*) a po kapkách se přidá čerstvě připravená *bromová voda R*. Po přidání nejvýše 0,5 ml vznikne žluté zbarvení trvající 30 min.

Zbytek po odpaření. Nejvýše 0,05 %. K 10,0 ml se přidá 25 ml *vody R*, odpaří se na vodní lázni a zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C.

Při použití v plynové chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku. Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Cinchonidin R

$C_{19}H_{22}N_2O$ M_r 294,4 CAS 485-71-2

(8*S*, 9*R*)-9-Cinchonanol

Bílý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě a v etheru petrolejovém, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

$[\alpha]_D^{20}$: -105 až -110°, měří se roztok v *lihu 96% R* (50,0 g/l).

TT: asi 208 °C, za rozkladu.

Uchovává se chráněn před světlem.

Cinchonin R

$C_{19}H_{22}N_2O$ M_r 294,4 CAS 118-10-5

(8*R*, 9*S*)-9-Cinchonanol

Bílý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a v methanolu, těžce rozpustný v v etheru.

$[\alpha]_D^{20}$: +225° až +230°, měří se roztok v *lihu 96% R* (50 g/l).

TT: asi 263 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Cinnamaldehyd R

C_9H_8O M_r 132,1 CAS 104-55-2

3-Fenyl-2-propenal, skořicový aldehyd

Nažloutlá až zelenavě žlutá olejovitá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, velmi snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: 1,048 až 1,051.

n_D^{20}: asi 1,620.

Uchovává se v chladu, chráněn před světlem.

Cín R

Sn A_r 118,7 CAS 7440-31-5

Stříbrobílá zrnka rozpustná v kyselině chlorovodíkové za vývoje vodíku.

Arsen (2.4.2). 0,1 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (10 μg/g).

Citral R

$C_{10}H_{16}O$ M_r 152,2 CAS 5392-40-5

Směs (2*E*)- a (2*Z*)-3,7-dimethyl-2,6-okta-dienalu

Světle žlutá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%, etherem a glycerolem.

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*. Na vrstvu se nanese 10 μl roztoku (1,0 g/l) v *toluenu R*. Chromatogram se vyvíjí směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá vysušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Citronan draselný R

Viz článek *Kalii citras.*

Citronan měďnatý RS

25 g *síranu měďnatého R*, 50 g *kyseliny citronové R* a 144,0 g *uhličitanu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml.

Citronan měďnatý RS1

25 g *síranu měďnatého R*, 50 g *kyseliny citronové R* a 144 g *uhličitanu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml. Roztok se upraví tak, aby vyhověl následujícím zkouškám:

a) Ke 25,0 ml se přidají 3 g *jodidu draselného R* a potom se opatrně přidá 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* 25% v malých dávkách. Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *škrobu RS* jako indikátoru před koncem titrace.
   Při této titraci se spotřebuje 24,5 ml až 25,5 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS.*
b) 10,0 ml se zředí *vodou R* na 100,0 ml a promíchá se. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a zahřívá se 1 h na vodní lázni. Ochladí se, doplní se na původní objem *vodou R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* jako indikátoru. Při této titraci se spotřebuje 5,7 ml až 6,3 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*
c) 10,0 ml se zředí *vodou R* na 100,0 ml a promíchá se. 10,0 ml tohoto roztoku se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* jako indikátoru.
   Při této titraci se spotřebuje 6,0 ml až 7,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Citronan sodný R

Viz článek *Natrii citras dihydricus*.

(+)-Citronellal R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,3 CAS 2385-77-5

(*R*)-3,7-Dimethyl-6-oktenal

Bezbarvá čirá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v ethanolu.

d_{20}^{20}: 0,848 až 0,856.

n_D^{20}: asi 1,447.

Citropten R

$C_{11}H_{10}O_4$ M_r 206,2 CAS 487-06-9

Limettin; 5,7-dimethoxykumarin

Jehličkovité krystalky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, etheru a etheru petrolejovém, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

TT: asi 145 °C.

Chromatografie (2.2.27). Na vrstvu *silikagelu GF $_{254}$R* se nanese 10 μl roztoku v *toluenu R* (1,0 g/l) a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Cyklohexan R

C_6H_{12} M_r 84,2 CAS 110-82-7

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s organickými rozpouštědly.

d_{20}^{20}: asi 0,78.

TV: asi 80,5 °C.

Při použití ve spektrofotometrii vyhovuje následujícímu dodatečnému požadavku:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 45 % při 220 nm, nejméně 70 % při 235 nm, nejméně 90 % při 240 nm, nejméně 98 % při 250 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Cyklohexan R1

Vyhovuje požadavkům předepsaným pro *cyklohexan R* a následujícímu požadavku:

Fluorescence měřená při 460 nm za budicího záření při 365 nm není intenzivnější než fluorescence roztoku obsahujícího 0,002 μg/ml *chininu R* v *kyselině sírové 0,05 mol/l RS.*

Cyklohexylamin R

$C_6H_{13}N$ M_r 99,2 CAS 108-91-8

Bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s běžnými organickými rozpouštědly.

n_D^{20}: asi 1,460.

TV: 134 °C až 135 °C.

Cysteiniumchlorid R

Viz článek *Cysteini hydrochloridum*.

L-Cystein R

$C_3H_7NO_2S$ M_r 121,1 CAS 52-90-4

Prášek, snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v kyselině octové, prakticky nerozpustný v acetonu.

L-Cystin R

$C_6H_{12}N_2O_4S_2$ M_r 240,3 CAS 56-89-3

Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. Rozkládá se při 250 °C.
$[\alpha]_D^{20}$: -218° až -224°, měří se v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS.*

Čerň amido 10 B R

$C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$ M_r 616,5 CAS 1064-48-8

Colour Index 20470, Schultz 299
Disodná sůl kyseliny 4-amino-5-hydroxy-3-(4-nitrofenylazo)-6-fenylazo-2,7-naftalendisulfonové
Tmavě hnědý až černý prášek, mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Čerň amido 10 B RS

Roztok *amidočerně 10 B R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové R* a *methanolu R* (10 + 90).

Čerň eriochromová T R

$C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$ M_r 461,4 CAS 1787-61-7

Colour Index 14645, Schultz 241
Sodná sůl kyseliny 1-(1-hydroxy-2-naftylazo)-6-nitro-2-naftol-4-sulfonové
Hnědočerný prášek, dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96 %.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Čerň eriochromová T s chloridem sodným R

Smíchá se 1,0 g *černě eriochromové T R* s 99 g *chloridu sodného R.*

Zkouška citlivosti. 50 mg se rozpustí ve 100 ml *vody R.* Roztok je hnědofialový. Po přidání 0,3 ml *amoniaku zředěného RS1* roztok zmodrá. Po následujícím přidání 0,1 ml roztoku *síranu hořečnatého R* (10,0 g/l) roztok zfialoví.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Červeň bromkresolová R

$C_{21}H_{16}Br_2O_5S$ M_r 540,2 CAS 115-40-2

5,5′-Dibrom-*o*-kresolsulfonftalein; 4,4′-(3*H*-2,1-benzoxathiol-3-yliden)bis(2-brom-6-methylfenol)-*S,S*-dioxid
Narůžovělý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Červeň bromkresolová RS

50 mg *červeně bromkresolové R* se rozpustí ve směsi 0,92 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,2 ml zkoušeného roztoku se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS.* Roztok je modrofialový. Ke změně zbarvení na žluté se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS.*

Barevný přechod. pH 5,2 až 6,8, ze žlutého zbarvení na modrofialové.

Červeň fenolová R

Viz článek *Phenolsulfonphthaleinum.*

Červeň fenolová RS

0,1 g *červeně fenolové R* se rozpustí ve směsi 2,82 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,1 ml zkoušeného roztoku se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.* Roztok je žlutý a přidáním nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* vznikne červenofialové zbarvení.

Barevný přechod. pH 6,8 (žlutá) až pH 8,4 (červenofialová).

Červeň fenolová RS2

Roztok I. 33 mg *červeně fenolové R* se rozpustí v 1,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se na 100 ml *vodou R.*
Roztok II. 25 mg *síranu amonného R* se rozpustí v 235 ml *vody R*; přidá se 105 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 135 ml *kyseliny octové zředěné RS.*

25 ml roztoku I se přidá k roztoku II. V případě potřeby se upraví hodnota pH na 4,7.

Červeň fenolová RS3

Roztok I. 33 mg *červeně fenolové R* se rozpustí v 1,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se na 50 ml *vodou R.*
Roztok II. 50 mg *síranu amonného R* se rozpustí v 235 ml *vody R*; přidá se 105 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 135 ml *kyseliny octové zředěné RS.*

25 ml roztoku I se přidá k roztoku II; v případě potřeby se upraví hodnota pH směsi na 4,7.

Červeň chinaldinová R

$C_{21}H_{23}IN_2$ M_r 430,3 CAS 117-92-0

2-{2-[4-(Dimethylamino)fenyl]vinylen}-1-ethylchinoliniumjodid

Tmavě modročerný prášek, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Červeň chinaldinová RS

0,1 g *červeně chinaldinové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Barevný přechod. pH 1,4 (bezbarvá) do pH 3,2 (červená).

Červeň Kongo R

$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ M_r 697 CAS 573-58-0

Colour Index 22120, Schultz 360

Disodná sůl 3,3′-{[1,1′-bifenyl]-4,4′-diylbis(azo)}bis(4-amino-1-naftalensulfonové kyseliny)

Červenohnědý prášek, dobře rozpustný ve vodě.

Červeň Kongo-fibrin R

Promytý fibrin rozřezaný na malé kousky se dá přes noc do roztoku *červeně Kongo R* (20 g/l) v roztoku *lihu R* 90% (*V/V*). Filtruje se, fibrin se promyje *vodou R* a uchovává se v *etheru R*.

Červeň kresolová R

$C_{21}H_{18}O_5S$ M_r 382,4 CAS 1733-12-6

o-Kresolsulfonftalein; 4,4′-(3*H*-2,1-benzoxathiol-3-yliden)bis(2-methylfenol)-*S,S*-dioxid

Červenohnědý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Červeň kresolová RS

0,1 g *červeně kresolové R* se rozpustí ve směsi 2,65 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,1 ml zkoušeného roztoku se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*. Zbarvení roztoku je purpurově červené a přidáním nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* se změní na žluté.

Barevný přechod. pH 7,0 až pH 8,6, ze žlutého zbarvení na červené.

Červeň methylová R

$C_{15}H_{15}N_3O_2$ M_r 269,3 CAS 493-52-7

Methylčerveň, kyselina 4′-dimethylaminoazobenzen-2-karboxylová
Colour Index 13020, Schultz 250

Tmavočervený prášek nebo fialové krystalky. Je prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%.

Červeň methylová RS

50 mg *červeně methylové R* se rozpustí ve směsi 1,86 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 50 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. Směs 0,1 ml zkoušeného roztoku a 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* je zbarvena červeně a přidáním nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* se změní na žluté.

Barevný přechod. Při pH 4,4 až pH 6,0 se červené zbarvení změní na žluté.

Červeň methylová směsný indikátor RS

0,1 g *červeně methylové R* a 50 mg *modře methylenové R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Barevný přechod. pH 5,2 (červenofialová) až 5,6 (zelená).

Červeň pravá B R

$C_{17}H_{13}N_3O_9S_2$ M_r 467,4 CAS 56315-29-8

Colour Index 37125, Schultz 155
2-Methoxy-4-nitrobenzendiazoniová sůl kyseliny 1,5-naftalendisulfonové

Oranžovožlutý prášek, dobře rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v lihu 96%.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem při teplotě 2 °C až 8 °C.

Červeň rutheniová R

$Cl_6H_{42}N_{14}O_2Ru_3 \cdot 4H_2O$ M_r 858 CAS 11103-72-3

Červený až nahnědlý prášek, dobře rozpustný ve vodě.

Červeň rutheniová RS

80 mg *červeně rutheniové R* se rozpustí ve 100 ml *octanu olovnatého RS.*

Červeň sudanová G R

$C_{17}H_{14}N_2O_2$ M_r 278,3

Colour Index 12150, Schultz 149
2-Hydroxy-1-[(2-methoxyfenyl)azo]naftalen
Červenohnědý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě.

Chromatografie (2.2.27). Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy *silikagelu G R.* Nanáší se 10 μl roztoku (0,10 g/l) v *dichlormethanu R* a vyvíjí se po dráze 10 cm stejným rozpouštědlem. Chromatogram vykazuje jen jednu hlavní skvrnu.

Danthron R

$C_{14}H_8O_4$ M_r 240,2 CAS 117-10-2

1,8-Dihydroxyanthrachinon
Oranžový krystalický prášek.
TT: asi 195 °C.

Dekan R

$C_{10}H_{22}$ M_r 142,3 CAS 124-18-5

Bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě.
n_D^{20}: asi 1,411.
TV: asi 174 °C.

Dekanol R

$C_{10}H_{22}O$ M_r 158,3 CAS 112-30-1

n-Decylalkohol
Viskózní kapalina, při asi 6 °C tuhnoucí, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a etheru.
n_D^{20}: asi 1,436.
TV: asi 230 °C.

Dekansulfonan sodný R

$C_{10}H_{22}NaO_3S$ M_r 245,3 CAS 13419-61-9

Krystalický prášek nebo bílé či téměř bílé šupinky. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu.

2′-Deoxyuridin R

$C_9H_{12}N_2O_5$ M_r 228,2 CAS 951-78-0

1-(2-Deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-1*H*,3*H*-pyrimidin-2,4-dion
TT: asi 165 °C.

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie za podmínek uvedených v článku *Idoxuridinum.* Nanáší se 5 μl roztoku (0,25 g/l). Získaný chromatogram vykazuje jenom jednu hlavní skvrnu.

Deuteriumoxid R

^2H_2O M_r 20,03 CAS 7789-20-0

Těžká voda
Stupeň deuterizace je nejméně 99,7 %.
d_{20}^{20}: asi 1,11.
n_D^{20}: asi 1,328.
TV: asi 101 °C.

Deuterizovaná kyselina octová R

$C_2{}^2H_4O_2$ M_r 64,1 CAS 1186-52-3

Kyselina tetradeuterooctová; kyselina-*d* octová-d_3
Stupeň deuterizace je nejméně 99,7 %.
d_{20}^{20}: asi 1,12.
n_D^{20}: asi 1,368.
TV: asi 115 °C.
TT: asi 16 °C.

Deuterizovaný aceton R

$C_3{}^2H_6O$ M_r 64,1 CAS 666-52-4

($^2H_6$)-Aceton; aceton-d_6
Stupeň deuterizace je nejméně 99,5 %.
Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s dimethylformamidem, s ethanolem, s etherem a s methanolem.
d_{20}^{20}: asi 0,87.
n_D^{20}: asi 1,357.
TV: asi 55 °C.

Voda a deuteriumoxid. Nejvýše 0,1 %.

Deuterizovaný dimethylsulfoxid R

$C_2{}^2H_6OS$ M_r 84,2 CAS 2206-27-1

($^2H_6$)-Dimethylsulfoxid; dimethylsulfoxid-d_6
Stupeň deuterizace je nejméně 99,8 %.
Velmi hygroskopická, viskózní, prakticky bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, v acetonu, v ethanolu a v etheru.
d_{20}^{20}: asi 1,18.
TV: asi 20 °C.

Voda a deuteriumoxid. Nejvýše 0,1 %.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Deuterizovaný chloroform R

C^2HCl_3 M_r 120,4 CAS 865-49-6

(^{2}H)-Chloroform; chloroform-*d*

Stupeň deuterizace je nejméně 99,7 %.

Čirá bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s acetonem, s lihem 96% a s etherem. Látka může být stabilizována pomocí stříbrné fólie.

d_{20}^{20}: asi 1,51.

n_D^{20}: asi 1,445.

TV: asi 60 °C.

Voda a deuteriumoxid. Nejvýše 0,05 %.

Deuterizovaný methanol R

C^2H_4O M_r 36,1 CAS 811-98-3

(^{2}H)-Methanol; methanol-*d*; tetradeuteromethanol

Stupeň deuterizace je nejméně 99,8 %.

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, lihem 96% a dichlormethanem.

d_{20}^{20}: asi 0,888.

n_D^{20}: asi 1,326.

TV: 65,4 °C.

Dextran síťovaný pro chromatografii R2

Síťovaný dextran ve formě kuliček vhodný k dělení peptidů a bílkovin o relativní molekulové hmotnosti $15 . 10^2$ až $30 . 10^3$. Vysušená forma má průměr kuliček 20 μm až 80 μm.

Dextran síťovaný pro chromatografii R3

Síťovaný dextran ve formě kuliček vhodný pro dělení peptidů a bílkovin s relativní molekulovou hmotností $4 . 10^3$ až $15 . 10^4$. Vysušená forma má průměr kuliček 40 μm až 120 μm.

3,3′-Diamoniumbenzidiniumtetrachlorid R

$C_{12}H_{18}Cl_4N_4 . 2H_2O$ M_r 396,1 CAS 7411-49-6

3,3′,4,4′-Bifenyltetramin

Většinou bílý nebo slabě růžový prášek, dobře rozpustný ve vodě.

TT: asi 280 °C.

Dibutylether R

$C_8H_{18}O$ M_r 130,2 CAS 142-96-1

Bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,77.

n_D^{20}: asi 1,399.

Jestliže látka nevyhovuje zkoušce na peroxidy, nedestiluje se.

Peroxidy. 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS* se přenese do skleněného uzavíratelného válce o objemu 12 ml a o průměru 1,5 cm. Zcela se naplní zkoušenou látkou, silně se protřepe a nechá se stát 30 min ve tmě; nevznikne žádné zbarvení.

Název a koncentrace přidaného stabilizátoru se uvedou v označení.

Dibutylftalat R

$C_{16}H_{22}O_4$ M_r 278,3 CAS 84-74-2

Dibutylbenzen-1,2-dikarboxylat

Čirá bezbarvá nebo slabě zbarvená olejovitá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s acetonem, s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: 1,043 až 1,048.

n_D^{20}: 1,490 až 1,495.

Dicyklohexylamin R

$C_{12}H_{23}N$ M_r 181,3 CAS 101-83-7

N,N-Dicyklohexylamin

Bezbarvá kapalina, mírně rozpustná ve vodě, mísitelná s většinou běžných organických rozpouštědel.

n_D^{20}: asi 1,484.

TV: asi 256 °C.

Teplota tuhnutí (2.2.18). 0 °C až 1 °C.

Dicyklohexylmočovina R

$C_{13}H_{24}N_2O$ M_r 224,4 CAS 2387-23-7

1,3-Dicyklohexylmočovina

Bílý krystalický prášek.

TT: asi 232 °C.

Diethanolamin R

$C_4H_{11}NO_2$ M_r 105,1 CAS 111-42-2

2,2′-Iminobisethanol

Čirá viskózní, slabě nažloutlá kapalina nebo rozplývající se krystalky, které tají při asi 28 °C. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, v acetonu a v methanolu.

Hodnota pH (2.2.3). 10,0 až 11,5; měří se roztok 50 g/l.

d_{20}^{20}: asi 1,09.

Při použití pro stanovení alkalické fosfatasy vyhovuje následující zkoušce:

Ethanolamin. Nejvýše 1,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *propanolaminu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,00 g *propanolaminu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Zkoušený roztok (a). 5,00 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Zkoušený roztok (b). 5,00 g se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztoky. 0,50 g *ethanolaminu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10,0 ml. K 0,5 ml, 1,0 ml a 2,0 ml tohoto roztoku se přidá po 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *acetonem R* na 10,0 ml.

Chromatografie se provede za vhodných podmínek, např. se použije:
- kolona délky 1,0 m a o vnitřním průměru 4 mm naplněná *difenylfenylenoxid-polymerem R* o velikosti částic 180 μm až 250 μm,
- *dusík pro chromatografii R* jako nosný plyn o průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizační detektor,
- teplota kolony: 125 °C po dobu 3 min, potom 300 °C při nárůstu 12 °C/min, teplota vstřikovacího prostoru: 250 °C, teplota detektoru: 280 °C.

Nastřikuje se 1 μl každého zkoušeného roztoku a 1 μl každého porovnávacího roztoku.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Diethoxytetrahydrofuran R

$C_8H_{16}O_3$ M_r 160,2 CAS 3320-90-9

2,5-Diethoxytetrahydrofuran, směs *cis*- a *trans*-izomerů

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, v etheru a ve většině organických rozpouštědel.

d_{20}^{20}: asi 0,98.

n_D^{20}: asi 1,418.

Diethylaminoethyldextran R

Aniontoměničová pryskyřice ve formě hydrochloridu. Je to prášek tvořící s vodou gel.

2-Diethylaminoethylamin R

$C_6H_{16}N_2$ M_r 116,2 CAS 100-36-7

N,N-Diethylethylendiamin

Bezbarvá nebo světle žlutá olejovitá kapalina, silného amoniakálního pachu, dráždící pokožku, oči a sliznice.

d_{20}^{20}: 0,827.

TV: 145 °C až 147 °C.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %, stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Diethylamin R

$C_4H_{11}N$ M_r 73,1 CAS 109-89-7

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, silně alkalická, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,71.

TV: asi 55 °C.

N,N-Diethylanilin R

$C_{10}H_{15}N$ M_r 149,2 CAS 91-66-7

TV: asi 217 °C.

TT: asi -38 °C.

Diethyldithiokarbaminan sodný R

$C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$ M_r 225,3 CAS 20624-25-3

Bílé nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%. Vodný roztok je bezbarvý.

Diethyldithiokarbaminan stříbrný R

$C_5H_{10}AgNS_2$ M_r 256,1 CAS 1470-61-7

Světle žlutý až šedožlutý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v pyridinu, velmi těžce rozpustný v chloridu uhličitém. Látku je možno připravit následovně: 1,70 g *dusičnanu stříbrného R* se rozpustí ve 100 ml *vody R* (roztok I). 2,3 g *diethyldithiokarbaminanu sodného R* se rozpustí ve 100 ml *vody R* (roztok II). Roztok I a II se ochladí na 10 °C a za míchání se smíchají. Vzniklá žlutá sraženina se převede na skleněný filtr, promyje se 200 ml studené *vody R* a 2 až 3 h se suší ve vakuu.

Látka je použitelná, jestliže není zbarvená a nevykazuje silný pach.

Diethylenglykol R

$C_4H_{10}O_3$ M_r 106,1 CAS 111-46-6

2,2′-Oxybisethanol

Obsahuje nejméně 99,5 % $C_4H_{10}O_3$.

Čirá bezbarvá hygroskopická kapalina, mísitelná s vodou, acetonem a lihem 96%.

$\boldsymbol{d_{20}^{20}}$: asi 1,118.

$\boldsymbol{n_D^{20}}$: asi 1,447.

TV: 244 °C až 246 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Diethylfenylendiamoniumsulfat R

$C_{10}H_{18}N_2O_4S$ M_r 262,3 CAS 6283-63-2

N,N′-Diethyl-*p*-fenylendiamoniumsulfat

Bílý nebo slabě nažloutlý prášek, dobře rozpustný ve vodě.

TT: asi 185 °C, za rozkladu.

Uchovává se chráněn před světlem.

Diethylfenylendiamoniumsulfat RS

K 250 ml *vody R* se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a 25 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l RS*. V tomto roztoku se rozpustí 1,1 g *diethylfenylendiamoniumsulfatu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

Uchovává se chráněn před světlem a teplem a je použitelný 1 měsíc. Může se použít jen bezbarvý roztok.

Difenylamin R

$C_{12}H_{11}N$ M_r 169,2 CAS 122-39-4

Bílé krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 55 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Difenylamin RS

1,0 g/l v *kyselině sírové R*.
Uchovává se chráněn před světlem.

Difenylamin RS1

10 g/l v *kyselině sírové R*. Roztok je bezbarvý.

Difenylamin RS2

1,0 g *difenylaminu R* se rozpustí ve 100 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 2,75 ml *kyseliny sírové R*. Připravuje se v čas potřeby.

Difenylanthracen R

$C_{26}H_{18}$ M_r 330,4 CAS 1499-10-1

Nažloutlý až žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v etheru.
TT: asi 248 °C.

Difenylbenzidin R

$C_{24}H_{20}N_2$ M_r 336,4 CAS 531-91-9

N,N′-Difenylbenzidin; N,N′-difenylbifenyl-4,4′-diamin
Bílý nebo světle šedý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v acetonu a v lihu 96%.
TT: asi 248 °C.

Dusičnany. 8 mg se rozpustí v chlazené směsi 45 ml *kyseliny sírové prosté dusičnanů R* a 5 ml *vody R*. Roztok je bezbarvý nebo velmi slabě modrý.

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,1 %.

Uchovává se chráněn před světlem.

Difenylboryloxyethylamin R

$C_{14}H_{16}BNO$ M_r 225,1 CAS 524-95-8

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný ve vodě.
TT: asi 193 °C.

Difenylfenylenoxid-polymer R

Poly(2,6-difenyl-*p*-fenyloxid)
Bílé až téměř bílé porézní kuličky. Velikost kuliček je uvedena za názvem zkoumadla v příslušné zkoušce.

Difenylkarbazid R

$C_{13}H_{14}N_4O$ M_r 242,3 CAS 140-22-7

1,5-Difenylkarbonohydrazid
Bílý krystalický prášek, který na vzduchu postupně růžoví, je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v kyselině octové ledové.

TT: asi 170 °C.

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,1 %.

Uchovává se chráněn před světlem.

Difenylkarbazid RS

0,20 g *difenylkarbazidu R* se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *ethanolem R* na 100 ml. Připraví se v čas potřeby.

Difenylkarbazon R

$C_{13}H_{12}N_4O$ M_r 240,3 CAS 538-62-5

1,5-Difenylkarbazon

Oranžově žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 157 °C, za rozkladu.

Difenyloxazol R

$C_{15}H_{11}NO$ M_r 221,3 CAS 92-71-7

2,5-Difenyloxazol

Bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v dioxanu a v kyselině octové ledové.

$A_{1cm}^{1\%}$: asi 1260; měří se roztok v *methanolu R* při 305 nm.

TT: asi 70 °C.

Při použití pro měření kapalinové scintilace má vhodnou analytickou jakost.

Difosforečnan sodný R

$Na_4P_2O_7 . 10H_2O$ M_r 446,1 CAS 13472-36-1

Dekahydrát difosforečnanu sodného; pyrofosforečnan sodný dekahydrát

Bezbarvé slabě zvětrávající krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě.

Digitonin R

$C_{56}H_{92}O_{29}$ M_r 1229 CAS 11024-24-1

3β-[O-β-D-glukopyranosyl-(1→3)-O-β-D-galaktopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O--β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galaktopyranosyloxy]-(25*R*)-5α-spirostan-2α,15β-diol

Krystalky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Digitoxin R

Viz článek *Digitoxinum*.

Dihydrogenfosforečnan amonný R

$(NH_4)H_2PO_4$ M_r 115,0 CAS 7722-76-1

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě.

Hodnota pH (2.2.3). 4,2; měří se roztok (23 g/l).

Dihydrogenfosforečnan draselný R

Viz článek *Kalii dihydrogenophosphas.*

Dihydrogenfosforečnan draselný 0,2 mol/l RS

Roztok obsahující 27,22 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* v 1000,0 ml.

Dihydrogenfosforečnan sodný R

Viz článek *Natrii dihydrogenophosphas dihydricus.*

Dihydrogenfosforečnan sodný bezvodý R

NaH_2PO_4 M_r 120,0 CAS 7558-80-7

Bílý hygroskopický prášek.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát R

$NaH_2PO_4 . H_2O$ M_r 138,0 CAS 10049-21-5

Bílé slabě zvětrávající krystaly nebo zrnka. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

10,11-Dihydrokarbamazepin R

$C_{15}H_{14}N_2O$ M_r 238,3 CAS 3564-73-6

10,11-Dihydro-5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepin-5-karboxamid
TT: 205 °C až 210 °C.

1,3-Dihydroxynaftalen R

$C_{10}H_8O_2$ M_r 160,2 CAS 132-86-5

1,3-Naftalendiol
Krystalický, obvykle hnědě fialový prášek, snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.
TT: asi 125 °C.

2,7-Dihydroxynaftalen R

$C_{10}H_8O_2$ M_r 160,2 CAS 582-17-2

2,7-Naftalendiol
Jehličky. Je dobře rozpustný ve vodě, lihu 96% a etheru.
TT: asi 190 °C.

2,7-Dihydroxynaftalen RS

10 mg *2,7-dihydroxynaftalenu R* se rozpustí ve 100 ml *kyseliny sírové R*. Roztok se nechá stát do odbarvení a je použitelný 2 dny.

Dichlorbenzen R

$C_6H_4Cl_2$ M_r 147,0 CAS 95-50-1

1,2-Dichlorbenzen

Bezbarvá olejovitá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v ethanolu a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 1,31.

TV: asi 180 °C.

Dichlorethan R

$C_2H_4Cl_2$ M_r 99,0 CAS 107-06-2

1,2-Dichlorethan; ethylenchlorid

Čirá bezbarvá kapalina, rozpustná asi ve 120 dílech vody a ve 2 dílech lihu 96%, mísitelná s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,25.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 82 °C až 84 °C.

Dichlorfenolindofenolat sodný R

$C_{12}H_6Cl_2NNaO_2 \cdot 2H_2O$ M_r 326,1 CAS 620-45-1

Dihydrát sodné soli 2,6-dichlor-N-(4-hydroxyfenyl)-1,4-benzochinonmonoiminu

Tmavě zelený prášek, snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu. Vodný roztok je tmavě modrý, okyselením se mění na růžový.

Dichlorfenolindofenolat sodný RS

50,0 mg *dichlorfenolindofenolatu sodného R* se rozpustí ve 100,0 ml *vody R* a zfiltruje se.

Standardizace. 20,0 mg *kyseliny askorbové R* se rozpustí v 10 ml čerstvě připraveného roztoku *kyseliny metafosforečné R (200 g/l)* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se titruje rychle zkoušeným roztokem, který se přidává z mikrobyrety dělené po 0,01 ml, dokud není růžové zbarvení stálé 10 s; titrace nesmí trvat déle než 2 min. Roztok dichlorfenolindofenolatu sodného se zředí *vodou R* tak, aby 1 ml roztoku odpovídal 0,1 mg kyseliny askorbové ($C_6H_8O_6$).

Použije se do tří dnů po přípravě. Standardizuje se bezprostředně před použitím.

Dichlorfluorescein R

$C_{20}H_{10}Cl_2O_5$ M_r 401,2 CAS 76-54-0

2′,7′-Dichlorfluorescein

Žlutohnědý až žlutooranžový prášek, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%. Se zředěnými roztoky alkalických hydroxidů dává roztok, který žlutozeleně fluoreskuje. Je prakticky nerozpustný v etheru.

Dichlorchinonchlorimid R

$C_6H_2Cl_3NO$ M_r 210,4 CAS 101-38-2

N-2,6-trichlor-1,4-benzochinonmonoimin

Světle žlutý nebo nazelenale žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96 % a ve zředěných roztocích alkálií.

TT: asi 66 °C.

Dichlormethan R

CH_2Cl_2 M_r 84,9 CAS 75-09-2

Methylenchlorid

Bezbarvá kapalina, mírně rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

TV: 39 °C až 42 °C.

Při použití pro fluorimetrii vyhovuje následující zkoušce:

Fluorescence (2.2.21). Fluorescence látky při budicím záření 365 nm měřená při 460 nm v 10 mm vrstvě není vyšší než fluorescence roztoku *chininu* (2 μg/ml) v *kyselině sírové 0,05 mol/l RS.*

Dichlormethan okyselený R

K 100 ml *dichlormethanu R* se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, protřepe se, nechá se stát a oddělí se obě vrstvy. Použije se spodní vrstva.

Dichlorvos R

$C_4H_7Cl_2O_4P$ M_r 221 CAS 62-73-7

2,2-Dichlorvinyldimethylfosfat

Bezbarvá až hnědožlutá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s většinou organických rozpouštědel.

n_D^{25}: 1,452.

Dichroman draselný R

$K_2Cr_2O_7$ M_r 294,2 CAS 7778-50-9

Oranžově červené krystalky. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Dichroman draselný používaný ke kalibraci spektrofotometrů *(2.2.25)* obsahuje nejméně 99,9 % $K_2Cr_2O_7$, počítáno na látku vysušenou při 130° C.

Stanovení obsahu. 1,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 250,0 ml. Do baňky o objemu 500 ml se převede 50,0 ml tohoto roztoku a přidá se čerstvě připravený roztok obsahující 4 g *jodidu draselného R*, 2,0 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R* ve 100 ml *vody R*. Baňka se uzavře a nechá se stát 5 min chráněná před světlem. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu prostého jodidů R* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,903 mg $K_2Cr_2O_7$.

Dichroman draselný RS

Roztok 106,0 g/l.

Dichroman draselný RS1

Roztok 5,0 g/l.

Dichroman draselný v kyselině dusičné RS

0,7 g *dichromanu draselného R* se rozpustí v *kyselině dusičné R* a zředí se jí na 100 ml.

Diisobutylketon R

$C_9H_{18}O$ M_r 142,2 CAS 108-83-8

Čirá bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s většinou organických rozpouštědel.
n_D^{20}: asi 1,414.
TV: asi 168 °C.

Diisopropylether R

$C_6H_{14}O$ M_r 102,2 CAS 108-20-3

Čirá bezbarvá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.
d_{20}^{20}: 0,723 až 0,728.
TV: 67 °C až 69 °C.

Jestliže zkoušená látka nevyhoví zkoušce na peroxidy, nedestiluje se.

Peroxidy. 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS* se přenese do 12ml skleněného uzavíratelného válce o průměru 1,5 cm. Zcela se naplní zkoušenou kapalinou, silně protřepe a nechá se stát ve tmě 30 min. Nevznikne žádné zbarvení.

Uchovává se chráněn před světlem.

Název a koncentrace přidaného stabilizátoru jsou uvedeny v označení na obalu.

Dikarboxidiniumchlorid R

$C_{20}H_{26}Cl_2N_2O_6$ M_r 461,3 CAS 56455-90-4

Dichlorid kyseliny 4,4′-[(4,4′-diamoniobifenyl-3,3′-diyl)-dioxy]dibutanové

Dimethylacetamid R

C_4H_9NO M_r 87,1 CAS 127-19-5

N,N-Dimethylacetamid

Obsahuje nejméně 99,5 % C_4H_9NO.

Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou a s většinou organických rozpouštědel.
d_{20}^{20}: asi 0,94.
n_D^{20}: asi 1,437.
TV: asi 165 °C.

Dimethylaminobenzaldehyd R

$C_9H_{11}NO$ M_r 149,2 CAS 100-10-7

4-Dimethylaminobenzaldehyd

Bílé nebo nažloutlé krystalky. Je dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných kyselinách.
TT: asi 74 °C.

Dimethylaminobenzaldehyd RS1

0,20 g *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Roztok se třepe s *aktivním uhlím R* a zfiltruje se. Intenzita zbarvení roztoku není větší než intenzita zbarvení *jodu RS3*.

Připravuje se v čas potřeby.

Dimethylaminobenzaldehyd RS2

0,20 g *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí bez zahřívání ve směsi 5,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 4,5 ml *vody R*.

Připravuje se v čas potřeby.

Dimethylaminobenzaldehyd RS3

0,25 g *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí ve směsi 45,0 ml *kyseliny octové ledové R*, 5,0 ml *kyseliny fosforečné R* a 45,0 ml *vody R*.

Dimethylaminobenzaldehyd RS6

0,125 g *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí v chlazené směsi 65 ml *kyseliny sírové R* a 35 ml *vody R*. Přidá se 0,1 ml roztoku *chloridu železitého R* (50 g/l). Před použitím se nechá stát 24 hodin, chráněn před světlem.

Při uchovávání při pokojové teplotě je použitelný jeden týden, při uchovávání v chladničce je možné jej používat po dobu několika měsíců.

Dimethylaminobenzaldehyd RS7

1,0 g *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. K roztoku se přidá 50 ml *lihu 96% R*. Roztok se uchovává chráněn před světlem a je použitelný 4 týdny.

4-Dimethylaminocinnamaldehyd R

$C_{11}H_{13}NO$ M_r 175,2 CAS 6203-18-5

3-(4-Dimethylaminofenyl)-2-propenal

Oranžové nebo oranžově hnědé krystaly nebo prášek. Je citlivý na světlo.

TT: asi 138 °C.

4-Dimethylaminocinnamaldehyd RS

2 g *4-dimethylaminocinnamaldehydu R* se rozpustí ve směsi 100 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 100 ml *ethanolu R*. Uchovává se na chladném místě. Bezprostředně před použitím se tento roztok zředí na čtyřnásobný objem *ethanolem R*.

Uchovává se na chladném místě.

Dimethylaminonaftalensulfonylchlorid R

$C_{12}H_{12}ClNO_2S$ M_r 269,8 CAS 605-65-2

5-Dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid

Žlutý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu.

TT: asi 70 °C.

Uchovává se v chladu.

N-Dimethylanilin R

$C_8H_{11}N$ M_r 121,2 CAS 121-69-7

Čirá olejovitá kapalina, čerstvě destilovaná téměř bezbarvá, prakticky nerozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru. Při skladování vzniká červenohnědé zbarvení.

n_D^{20}: asi 1,558.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 192 °C až 194 °C.

2,6-Dimethylanilin R

$C_8H_{11}N$ M_r 121,2 CAS 87-62-7

Bezbarvá kapalina, mírně rozpustná ve vodě, rozpustná v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,98.

2,6-Dimethylfenol R

$C_8H_{10}O$ M_r 122,2 CAS 576-26-1

Bezbarvé jehlice. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: 46 °C až 48 °C.

TV: asi 203 °C.

3,4-Dimethylfenol R

$C_8H_{10}O$ M_r 122,2 CAS 95-65-8

Bílé nebo téměř bílé krystaly, těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%.

TV: asi 226 °C.

TT: 25 °C až 27 °C.

Dimethylformamid R

C_3H_7NO M_r 73,1 CAS 68-12-2

Čirá bezbarvá neutrální kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: 0,949 až 0,952.

TV: asi 153 °C.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,1 %.

Dimethylglyoxim R

$C_4H_8N_2O_2$ M_r 116,1 CAS 95-45-4

Diacetyldioxim

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě, velmi těžce rozpustný ve vroucí vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 240 °C, za rozkladu.

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,05 %.

N,N-Dimethyloktylamin R

$C_{10}H_{23}N$ M_r 157,3 CAS 7378-99-6

Oktyldimethylamin

Bezbarvá kapalina.

TV: asi 195 °C.

d_{20}^{20}: asi 0,765.

n_D^{20}: asi 1,424.

Dimethylpiperazin R

$C_6H_{14}N_2$ M_r 114,2 CAS 106-58-1

1,4-Dimethylpiperazin

Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,85.

n_D^{20}: asi 1,446.

TV: asi 131 °C.

Dimethylstearamid R

$C_{20}H_{41}NO$ M_r 311,6

N,N-Dimethyloktadekanamid

Bílá nebo téměř bílá pevná hmota. Je dobře rozpustný ve většině organických rozpouštědel, včetně acetonu.

TT: asi 51 °C.

Dimethylsulfon R

$C_2H_6O_2S$ M_r 94,1 CAS 67-71-0

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a lihu 96%.

TT: 108 °C až 110 °C.

Dimethylsulfoxid R

C_2H_6OS M_r 78,1 CAS 67-68-5

Čirá bezbarvá olejovitá hygroskopická kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 1,10.

TV: asi 189 °C.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 10 g/l.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následujícím požadavkům:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 10 % při 262 nm, nejméně 35 % při 270 nm, nejméně 70 % při 290 nm, nejméně 98 % při 340 nm a výše, měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dimethyltetradecylamin R

$C_{16}H_{35}N$ M_r 241,5

N,N-Dimethyltetradecylamin

Obsahuje 98,0 % až 101,0 % $C_{16}H_{35}N$.

Čirá nebo téměř čirá bezbarvá až slabě nažloutlá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s acetonem, s lihem 96% a methanolem.

d_{20}^{20}: asi 0,80.

TV: asi 260 °C.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,3 %.

Stanovení obsahu. 0,200 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*. Po přidání 0,1 ml *červeně methylové RS* se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do červeného zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,15 mg $C_{16}H_{35}N$.

Dimidiumbromid R

$C_{20}H_{18}BrN_3$ M_r 380,3 CAS 518-67-2

3,8-Diamino-5-methyl-6-fenylfenanthridiniumbromid

Tmavě červené krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě při 20 °C, mírně rozpustný ve vodě při 60 °C a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Dimidiumbromid se sulfanovou modří RS

Zvlášť se rozpustí 0,5 g *dimidiumbromidu R* a 0,25 g *modře sulfanové R* ve 30 ml horké směsi 1 objemového dílu *ethanolu R* a 9 objemových dílů *vody R*. Po zamíchání se oba roztoky smíchají a zředí se stejnou směsí na 250 ml. 20 ml tohoto roztoku se smíchá s 20 ml roztoku *kyseliny sírové R* 14% *(V/V)* předem zředěné asi 250 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 500 ml.

Uchovává se chráněn před světlem.

Dinitrobenzen R

$C_6H_4N_2O_4$ M_r 168,1 CAS 528-29-0

1,3-Dinitrobenzen

Slabě žluté krystalky nebo krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96 %.

TT: asi 90 °C.

Dinitrobenzen RS

10 g/l v *lihu 96% R*.

Dinitrobenzoylchlorid R

$C_7H_3ClN_2O_5$ M_r 230,6 CAS 99-33-2

3,5-Dinitrobenzoylchlorid

Světle žlutý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky.

TT: asi 68 °C.

Dinitrofenylhydrazin R

$C_6H_6N_4O_4$ M_r 198,1 CAS 119-26-6

2,4-Dinitrofenylhydrazin

Červenooranžové krystalky. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 203 °C *(2.2.16)*.

Dinonylftalat R

$C_{26}H_{42}O_4$ M_r 418,6 CAS 28553-12-0

Bis(3,5,5-trimethylhexyl)ftalat

Bezbarvá až světle žlutá, viskózní kapalina.

d_{20}^{20}: 0,97 až 0,98.

n_D^{20}: 1,482 až 1,489.

Kysele reagující látky. 5,0 g se třepe 1 min s 25 ml *vody R*. Po oddělení se vodná vrstva zfiltruje a přidá se k ní 0,1 ml *fenolftaleinu RS.* Ke změně zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* (0,05 %, počítáno jako kyselina ftalová).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,1 %.

Dioktadecyldisulfid R

$C_{36}H_{74}S_2$ M_r 571,1 CAS 1844-09-3

Bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě.

TT: 53 °C až 58 °C.

Dioxan R

$C_4H_8O_2$ M_r 88,1 CAS 123- 91-1

1,4-Dioxan

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou a s většinou organických rozpouštědel.

d_{20}^{20}: asi 1,03.

Teplota tuhnutí (2.2.18). 9 °C až 11 °C.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %.

Jestliže nevyhovuje zkoušce na peroxidy, nedestiluje se.

Peroxidy. 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS* se převede do 12ml skleněného uzavíratelného válce o průměru 1,5 cm. Naplní se zkoušenou látkou, silně se protřepe a nechá se stát ve tmě 30 min. Nevznikne žádné zbarvení.

Při použití pro měření kapalinové scintilace má vhodnou analytickou jakost.

Dioxan RS

50,0 ml *dioxanu základního RS* se zředí *vodou R* na 100,0 ml (0,5 mg $C_4H_8O_2$/ml).

Dioxan RS1

10,0 ml *dioxanu RS* se zředí *vodou R* na 50,0 ml (0,1 mg $C_4H_8O_2$/ml).

Dioxan základní RS

1,00 g *dioxanu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml (1,0 mg $C_4H_8O_2$/ml).

Disiřičitan sodný R

Viz článek *Natrii disulfis*.

Dithiol R

$C_7H_8S_2$ M_r 156,3 CAS 496-74-2

4-Methyl-1,2-benzendithiol, 3,4-dimerkaptotoluen

Bílé hygroskopické krystalky. Je dobře rozpustný v methanolu a roztocích alkalických hydroxidů.

TT: asi 30 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsném obalu.

Dithioničitan sodný R

$Na_2S_2O_4$ M_r 174,1 CAS 7775-14-6

Bílý až šedobílý krystalický prášek, na vzduchu oxiduje, je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%. Uchovává se ve vzduchotěsných nádobách.

Dithiothreitol R

$C_4H_{10}O_2S_2$ M_r 154,2 CAS 27565-41-9

threo-1,4-Dimerkapto-2,3-butandiol

Slabě hygroskopické jehlice. Je snadno rozpustný ve vodě, v acetonu a v ethanolu.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dithizon R

$C_{13}H_{12}N_4S$ M_r 256,3 CAS 60-10-6

1,5-Difenylthiokarbazon

Modročerný, hnědočerný nebo černý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se chráněn před světlem.

Dithizon RS

Roztok v *chloroformu R* (0,5 g/l). Připraví se v čas potřeby.

Dithizon RS2

40,0 mg *dithizonu R* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 1000,0 ml. 30,0 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 100,0 ml.

Standardizace. Množství *chloridu rtuťnatého R* odpovídající 0,1354 g $HgCl_2$ se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny sírové zředěné RS* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se stejnou směsí zředí na 100,0 ml (tento roztok obsahuje 20 μg Hg/ml). 1,0 ml tohoto roztoku se smíchá v dělicí nálevce s 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 140 ml *vody R* a 10 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (200 g/l). Směs se titruje zkoušeným roztokem, přičemž po každém přidání se 20krát protřepe. Před koncem titrace se vrstvy nechají oddělit a sleduje se chloroformová vrstva. Titruje se do modrozeleného zbarvení chloroformové vrstvy. Množství rtuti odpovídající zkoušenému roztoku (mg/ml) se vypočítá ze vztahu 20/*V*, v němž *V* značí při titraci spotřebovaný objem zkoušeného roztoku v ml.

Dodecylsíran sodný R

Viz článek *Natrii laurilsulfas* s výjimkou obsahu, který je nejméně 99,0 %.

Dotriakontan R

$C_{32}H_{66}$ M_r 450,9 CAS 544-85-4

n-Dotriakontan

Bílé plátky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v hexanu, těžce rozpustný v etheru.

TT: asi 69 °C.

Nečistoty. Nejvýše 0,1 % nečistot se stejnou hodnotou t_R jako α-tokoferolacetat stanovených plynovou chromatografií za podmínek předepsaných v článku *Tocoferoli alfa acetas.*

Dusičnan amonný R

NH_4NO_3 M_r 80,0 CAS 6484-52-2

Bílý krystalický prášek nebo průhledné krystalky. Je hygroskopický, větrající, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dusičnan amonný R1

NH_4NO_3 M_r 80,0 CAS 6484-52-2

Vyhovuje požadavkům uvedeným pro *Dusičnan amonný R* a následujícím dodatečným požadavkům:

Kysele reagující látky. Roztok látky je nepatrně kyselý (*2.2.4*).

Chloridy (2.4.4). 0,50 g vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Sírany (2.4.13). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 µg/g).

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,05 %, stanoví se s 1,0 g.

Dusičnan ceritý R

$Ce(NO_3)_3 . 6H_2O$ M_r 434,3 CAS 10294-41-4

Bezbarvý až slabě žlutý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě a lihu 96%.

Dusičnan draselný R

KNO_3 M_r 101,1 CAS 7757-79-1

Bezbarvé krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě.

Dusičnan hlinitý R

$Al(NO_3)_3 . 9H_2O$ M_r 375,1 CAS 7784-27-2

Rozpadající se krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dusičnan hořečnatý R

$Mg(NO_3)_2 . 6H_2O$ M_r 256,4 CAS 13446-18-9

Bezbarvé průsvitné, rozpadající se krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dusičnan kobaltnatý R

$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$ M_r 291,0 CAS 10026-22-9

Malé červené krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě.

Dusičnan lanthanitý R

$La(NO_3)_3 . 6H_2O$ M_r 433,0 CAS 10277-43-7

Bezbarvé rozpadající se krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě.

Dusičnan lanthanitý RS

Roztok 50 g/l.

Dusičnan měďnatý R

$Cu(NO_3)_2 . 3H_2O$ M_r 241,6 CAS 10031-43-3

Tmavě modré krystalky, hygroskopické, velmi snadno rozpustné ve vodě, kde dávají silně kyselou reakci, snadno rozpustné v lihu 96% a ve zředěné kyselině dusičné.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dusičnan olovnatý R

$Pb(NO_3)_2$ M_r 331,2 CAS 10099-74-8

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě.

Dusičnan olovnatý RS

Roztok 33 g/l.

Dusičnan-oxid bismutitý R

$4BiNO_3(OH)_2 . BiO(OH)$ M_r 1462 CAS 1304-85-4

Bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě.

Dusičnan-oxid bismutitý R1

Obsahuje nejméně 71,5 % až 74,0 % bismutu (Bi) a nejméně 14,5 % až 16,5 % dusičnanů, počítáno jako oxid dusičný (N_2O_5).

Dusičnan-oxid bismutitý RS

5 g *dusičnan-oxidu bismutitého R1* se rozpustí ve směsi 8,4 ml *kyseliny dusičné R* a 50 ml *vody R* a zředí se jí na 250 ml. V případě nutnosti se zfiltruje.

Kysele reagující látky. K 10 ml se přidá 0,05 ml *oranže methylové RS.* Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje 5,0 ml až 6,25 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS.*

Dusičnan-oxid zirkoničitý R

Dusičnan-oxid zirkoničitý je bazická sůl odpovídající přibližnému vzorci $ZrO(NO_3)_2 .2H_2O$

Bílý prášek nebo krystalky. Je hygroskopický, dobře rozpustný ve vodě. Vodný roztok je čirý nebo slabě opalizující.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dusičnan-oxid zirkoničitý RS

Roztok *dusičnan-oxidu zirkoničitého R* (1,0 g/l) ve směsi 40 ml *vody R* a 60 ml *kyseliny chlorovodíkové R.*

Dusičnan rtuťnatý R

$Hg(NO_3)_2 . H_2O$ M_r 342,6 CAS 7782-86-7

Bezbarvé nebo slabě zbarvené krystaly, hygroskopické, dobře rozpustné ve vodě za přítomnosti malého množství kyseliny dusičné *R*.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Dusičnan sodný R

$NaNO_3$ M_r 85,0 CAS 7631-99-4

Bílý prášek, zrnka nebo bezbarvé průsvitné krystalky roztékající se vzdušnou vlhkostí. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Dusičnan stříbrný R

Viz článek *Argenti nitras*.

Dusičnan stříbrný RS1

Roztok 42,5 g/l.

Uchovává se chráněn před světlem.

Dusičnan stříbrný RS2

Roztok 17 g/l.

Uchovává se chráněn před světlem.

Dusičnan stříbrný amoniakální RS

2,5 g *dusičnanu stříbrného R* se rozpustí v 80 ml *vody R*. K tomuto roztoku se za třepání po kapkách přidává *amoniak RS1,* až se vzniklá sraženina opět rozpustí. Potom se zředí *vodou R* na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Dusičnan stříbrný v pyridinu RS

Roztok 85 g/l v *pyridinu R*.

Uchovává se chráněn před světlem.

Dusík R

N_2 M_r 28,01 CAS 7727-37-9

Promytý a vysušený dusík.

Dusík R1

Nejméně 99,999 % N_2 (*V/V*).

Kyslík. Méně než 5 ml/m^3.

Oxid uhelnatý. Méně než 5 ml/m^3.

Dusík pro chromatografii R

Nejméně 99,95 % (*V/V*) N_2.

Dusík prostý kyslíku R

Je to *dusík R* zbavený kyslíku probubláním přes *pyrogallol zásaditý RS*.

Dusitan sodný R

$NaNO_2$ M_r 69,0 CAS 7632-00-0

Obsahuje nejméně 97,0 % $NaNO_2$.
Bílý prášek, zrnka nebo slabě světle žlutý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě.

Dusitan sodný RS

Roztok 100 g/l.
Připravuje se v čas potřeby.

Edetan disodný R

Chelaton 3
Viz článek *Dinatrii edetas dihydricus*.

Edetan měďnatý RS

Ke 2 ml roztoku *octanu měďnatého R* (20 g/l) se přidají 2 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml.

Emetiniumchlorid R

Viz článek *Emetini dihydrochloridum pentahydricum*.

Emodin R

$C_{15}H_{10}O_5$ M_r 270,2 CAS 518-82-1

1,3,8-Trihydroxy-6-methylanthrachinon
Oranžově červené jehličky, prakticky nerozpustné ve vodě, těžce rozpustné v etheru, dobře rozpustné v lihu 96% a v roztocích alkalických hydroxidů.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Rhei radix.* Na chromatogramu je jedna hlavní skvrna.

Erukamid R

$C_{22}H_{43}NO$ M_r 337,6 CAS 112-84-5

(*Z*)-13-Dokosenamid
Nažloutlý nebo bílý prášek nebo granule. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v ethanolu.
TT: asi 70 °C.

Erytrocyty králičí suspenze R

Připraví se suspenze králičích erytrocytů 1,6% (*V/V*) následujícím postupem: 15 ml čerstvě odebrané králičí krve se třepáním se skleněnými kuličkami defibrinuje a odstřeďuje se 10 min při 2000 g_n. Erytrocyty se třikrát promyjí 30 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). 1,6 ml této suspenze se zředí směsí objemových dílů *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,2* a roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) (1 + 9) na 100 ml.

Escin R

CAS 11072-93-8

β-Aescin

Směs příbuzných saponinů ze semen *Aesculus hippocastanum* L. Jemný téměř bílý nebo slabě načervenalý či nažloutlý amorfní prášek.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek popsaných v článku *Polygalae radix*; nanáší se 20 μl roztoku. Po postřiku chromatogramu *anisaldehydem RS* a zahřátí je na chromatogramu patrna hlavní skvrna o R_F asi 0,4.

17α-Estradiol R

$C_{18}H_{24}O_2$ M_r 272,4 CAS 57-91-0

1,3,5-Estratrien-3,17α-diol

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly.

TT: 178 °C až 179 °C.

Estragol R

$C_{10}H_{12}O$ M_r 148,2 CAS 140-67-0

4-Allylanisol; 1-methoxy-4-(2-propenyl)benzen

Kapalina, mísitelná s lihem 96%.

n_D^{20}: asi 1,52.

TT: asi 216 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Anisi etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Ethanolamin R

C_2H_7NO M_r 61,1 CAS 141-43-5

2-Aminoethanol

Čirá bezbarvá viskózní hygroskopická kapalina, mísitelná s vodou a s methanolem, mírně rozpustná v etheru.

d_{20}^{20}: asi 1,04.

n_D^{20}: asi 1,454.

TT: asi 11 °C.

Ethanol R

C_2H_6O M_r 46,07 CAS 64-17-5

Obsahuje nejméně 99,5 % C_2H_6O (*V/V*).

Čirá bezbarvá, hořlavá, lehce pohyblivá kapalina, mísitelná s vodou, s acetonem, s etherem a s glycerolem.

d_{20}^{20}: 0,791 až 0,794.

TV: 78 °C až 79 °C.

Uchovává se chráněn před světlem a při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Ethanol R1

Vyhovuje požadavkům uvedeným v odstavci *Ethanol R* a následující zkoušce:

Methanol. Nejvýše 0,005 % (*V/V*); stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. Zkoušená látka.

Porovnávací roztok. 0,50 ml *methanolu bezvodého R* se zředí zkoušenou látkou na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušenou látkou na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- skleněné kolony 2 m dlouhé a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (75 μm až 100 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 130 °C, vstřikovacího prostoru na 150 °C a detektoru na 200 °C. Vstřikuje se 1 μl zkoušené látky a porovnávacího roztoku. Před každým dalším nástřikem se kolona zahřívá 8 min při 230 °C. Obsah methanolu v procentech se vypočítá podle vzorce:

v
n ě
mž
značí:

$$\frac{a \cdot b}{c - b},$$

a - množství methanolu v porovnávacím roztoku (*V/V*) v procentech,

b - plochu píku odpovídajícího methanolu na chromatogramu zkoušené látky,

c - plochu píku odpovídajícího methanolu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Ether R

Viz článek *Ether solvens*.

Ether prostý peroxidických látek R

Viz článek *Ether anestheticus.*

Ether petrolejový R

CAS 8032-32-4

Čirá bezbarvá hořlavá nefluoreskující kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.

d_{20}^{20}: 0,661 až 0,664.

Destilační rozmezí (2.2.11). 50 °C až 70 °C.

Ether petrolejový R1

Vyhovuje požadavkům předepsaným v odstavci *Ether petrolejový R* a následujícím požadavkům.
d_{20}^{20}: 0,630 až 0,656.
Destilační rozmezí (2.2.11). 40 °C až 60 °C.

Kapalina se nekalí při 0 °C.

Ether petrolejový R2

Vyhovuje požadavkům předepsaným v odstavci *Ether petrolejový R* a následujícím požadavkům.
d_{20}^{20}: 0,620 až 0,630.
Destilační rozmezí (2.2.11). 30 °C až 40 °C.

Kapalina se nekalí při 0 °C.

Ethoxychrysoidiniumchlorid R
$C_{14}H_{17}ClN_4O$ M_r 292,8

2,4-Diamino-4′-ethoxyazobenzen hydrochlorid

Načervenalý prášek, dobře rozpustný v lihu 96%.

Ethoxychrysoidiniumchlorid RS

1,0 g/l v *lihu 96% R.*

Zkouška citlivosti. Ke směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,05 ml *ethoxychrysoidiniumchloridu RS* se přidá 0,05 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l s bromidem draselným VS;* během 2 min se červené zbarvení změní na světle žluté.

Ethoxyethanol R
$C_4H_{10}O_2$ M_r 90,1 CAS 110-80-5

2-Ethoxyethanol; ethylenglykolmonoethylether

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s acetonem, s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,93.
n_D^{20}: asi 1,406.
TV: asi 135 °C.

Ethylacetat R
$C_4H_8O_2$ M_r 88,1 CAS 141-78-6

Čirá bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.
d_{20}^{20}: 0,901 až 0,904.
TV: 76 °C až 78 °C.

Ethylacetat upravený RS

200 g *kyseliny amidosírové R* se disperguje v *ethylacetatu R* a zředí se jím na 1000 ml. Suspenze se míchá tři dny a zfiltruje se přes papírový filtr.

Použitelnost je jeden měsíc od přípravy.

Ethylakrylat R

$C_5H_8O_2$ M_r 100,1 CAS 140-88-5

Ethyl-2-propenoat

Bezbarvá kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,924.

n_D^{20}: asi 1,406.

TT: asi -71 °C.

TV: asi 99 °C.

4-(Ethylaminomethyl)pyridin R

$C_8H_{12}N_2$ M_r 136,2 CAS 33403-97-3

Světle žlutá kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,98.

n_D^{20}: asi 1,516.

TV: asi 98 °C.

Ethylbenzen R

C_8H_{10} M_r 106,2 CAS 100-41-4

Obsahuje nejméně 99,5 % C_8H_{10}; stanoví se plynovou chromatografií.

Čirá bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v acetonu a v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,87.

n_D^{20}: asi 1,496.

TV: asi 135 °C.

Ethylenchlorid R

Viz *Dichlorethan R.*

Ethylendiamin R

$C_2H_8N_2$ M_r 60,1 CAS 107-15-3

1,2-Diaminoethan

Čirá bezbarvá dýmající kapalina, silně alkalická, mísitelná s vodou a s lihem 96%, těžce rozpustná v etheru.

TV: asi 116 °C.

Ethylenglykol R

$C_2H_6O_2$ M_r 62,1 CAS 107-21-1

1,2-Ethandiol

Bezbarvá viskózní kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%, těžce rozpustná v etheru.

d_{20}^{20}: 1,113 až 1,115.

n_D^{20}: 1,430 až 1,433.

TV: asi 196 °C.

Kysele reagující látky. K 10 ml se přidá 20 ml *vody R* a 1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke vzniku růžového zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS.*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %.

Ethylenoxid R

C_2H_4O M_r 44,05 CAS 75-21-8

Oxiran

Bezbarvý hořlavý plyn, velmi dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Teplota zkapalnění. Asi 12 °C.

Ethylenoxid základní RS

Všechny operace prováděné při přípravě těchto roztoků musí být prováděny v digestoři. Pracovník musí chránit obě ruce a obličej nošením polyethylenových ochranných rukavic a vhodné obličejové ochranné masky.

Všechny roztoky se uchovávají ve vzduchotěsných obalech v chladničce při 4 °C až 8 °C. Všechna stanovení se provádějí třikrát.

Do suché čisté zkumavky chlazené ve směsi 1 dílu *chloridu sodného R* a 3 dílů rozdrceného ledu se zavádí pomalý proud plynného *ethylenoxidu R* a nechá se kondenzovat na vnitřní stěně zkumavky. Za použití skleněné injekční stříkačky, předtím zchlazené na -10 °C, se vstříkne asi 300 µl (odpovídá asi 0,25 g) kapalného *ethylenoxidu R* do 50 ml *makrogolu 200 R1*. Absorbované množství ethylenoxidu se stanoví vážením před a po absorpci (M_{EO}). 100,0 ml se zředí *makrogolem 200 R1*. Před použitím se dobře promíchá.

Stanovení obsahu. K 10 ml suspenze *chloridu hořečnatého R* (500 g/l) v *ethanolu R* v baňce se přidá 20,0 ml *kyseliny chlorovodíkové v lihu 0,1 mol/l VS*. Zazátkuje se a protřepe se k získání nasyceného roztoku a nechá se stát přes noc k ustavení rovnováhy. 5,00 g *ethylenoxidu základního RS (2,5 g/l)* se odváží do baňky a nechá se 30 min stát. Titruje se *hydroxidem draselným v lihu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

Provede se slepá zkouška, při níž se zkoušená látka nahradí stejným množstvím *makrogolu 200 R1*.

Obsah ethylenoxidu v mg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{(V_0 - V_1) \cdot f \cdot 4{,}404}{m},$$

v němž značí:

V_0 a V_1 - objemy spotřeby *hydroxidu draselného v lihu 0,1 mol/l VS* při slepé zkoušce a titraci (ml),

f - faktor *hydroxidu draselného v lihu 0,1 mol/l VS*,

m - hmotnost vzorku (g).

Ethylenoxid RS

Množství vychlazeného *ethylenoxidu základního RS* odpovídající 2,5 mg ethylenoxidu se naváží do vychlazené baňky a zředí se na 50,0 g *makrogolem 200 R1*. Dobře se promíchá a 2,5 g tohoto roztoku se zředí na 25,0 ml *makrogolem 200 R1* (5 µg ethylenoxidu v gramu roztoku). Připraví se bezprostředně před použitím.

Ethylenoxid RS1

1,0 ml vychlazeného *ethylenoxidu základního RS* (přesný objem se zjistí vážením) se zředí *makrogolem 200 R1* na 50,0 ml. Dobře se promíchá a 2,5 g tohoto roztoku se zředí *makrogolem 200 R1* na 25,0 ml. Vypočítá se přesně množství ethylenoxidu v µg/ml z objemu stanoveného při vážení a za použití hustoty *makrogolu 200 R1* 1,127. Připraví se bezprostředně před použitím.

Ethylenoxid RS2

Připraví se těsně před použitím. Do vychlazené baňky obsahující 40,0 g ochlazeného *makrogolu 200 R1* se odváží 1,00 g vychlazeného *ethylenoxidu základního RS* odpovídajícího 2,5 mg ethylenoxidu. Promíchá se a skutečná navážka se zředí s ohledem na vypočítanou hmotnost tak, aby byl získán roztok obsahující 50 µg ethylenoxidu v gramu roztoku. Naváží se 10,00 g do baňky obsahující asi 30 ml *vody R*, promíchá se a zředí se *vodou R* na 50,0 ml (10 µg/ml).

Ethylenoxid RS3

Připraví se těsně před použitím. 10,0 ml *ethylenoxidu RS2* se zředí *vodou R* na 50,0 ml (2 µg/ml).

Ethylformiat R

$C_3H_6O_2$ M_r 74,1 CAS 109-94-4

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, snadno rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,919.
n_D^{20}: asi 1,36.
TV: asi 54 °C.

1,1′-Ethylidenbistryptofan R

$C_{24}H_{26}N_4O_4$ M_r 434,5 CAS 132685-02-0

Kyselina 3,3′-[ethylidenbis(1*H*-indol-1,3-diyl)]bis[(2*S*)-2-aminopropanová; kyselina 1,1′-ethylidenbistryptofanová

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.
TT: asi 223 °C, za rozkladu.

Stanovení obsahu. Postupuje se, jak je uvedeno v článku *Tryptophanum* ve zkoušce 1,1′-Ethylidenbistryptofan a jiné příbuzné látky. Plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 98,0 % plochy všech píků.

Ethylkyanoacetat R

$C_5H_7NO_2$ M_r 113,1 CAS 105-56-6

Bezbarvá až světle žlutá kapalinaa, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.
TV: 205 °C až 209 °C, za rozkladu.

N-Ethylmaleinimid R

$C_6H_7NO_2$ M_r 125,1 CAS 128-53-0

1-Ethyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion

Bezbarvé krystaly, mírně rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%.
TT: 41 °C až 45 °C.

Uchovává se při teplotě 2 °C až 8 °C.

Ethylparaben R

Viz článek *Ethylparabenum.*

Ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymer R

Porézní pevné kuličky ze síťovaného polymeru. Je dodáván v různých druzích o rozdílných velikostech kuliček. Velikost kuliček je uvedena u názvu zkoumadla v příslušné zkoušce.

Ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymer R1

Porézní pevné kuličky ze síťovaného polymeru se specifickým povrchem 500 m^2/g až 600 m^2/g a s póry o středním průměru 7,5 nm. Jsou dodávány v různých druzích a rozdílných velikostech kuliček. Velikost kuliček je uvedena u názvu zkoumadla v příslušné zkoušce.

Eugenol R

$C_{10}H_{12}O_2$ M_r 164,2 CAS 97-53-0

4-Allyl-2-methoxyfenol

Bezbarvá nebo slabě žlutá olejovitá kapalina, na vzduchu a světle tmavne a stává se viskóznější, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%, s etherem, mastnými oleji a silicemi.
d_{20}^{20}: asi 1,07.
TV: asi 250 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za podmínek předepsaných v článku *Caryophylli etheroleum;* jako zkoušený roztok se použije zkoušená látka.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % celkové plochy píků.

Uchovává se chráněn před světlem.

Euglobuliny hovězí R

Pro přípravu se použije čerstvá hovězí krev odebraná do protisrážlivého roztoku (například roztoku citronanu sodného). Nepoužije se hemolyzovaná krev. Odstřeďuje se při nejméně 1500 g_n až 1800 g_n při 15 °C až 20 °C do získání supernatantní plazmy chudé na krevní destičky.

K 1 l hovězí plazmy se přidá 75 g *síranu barnatého R,* 30 min se třepe a odstřeďuje se při 1500 g_n až 1800 g_n při 15 °C až 20 °C. Čirá supernatantní tekutina se oddělí, přidá se 10 ml roztoku *aprotininu R* (0,2 mg/ml) a dobře se protřepe. Do nádoby o objemu nejméně 30 l v místnosti vychlazené na 4 °C se převede 25 l *vody destilované R* o teplotě 4 °C a přidá se 500 g pevného oxidu uhličitého. Ihned za míchání se přidá supernatantní tekutina získaná z plazmy. Vznikne bílá sraženina, která se nechá stát 10 h až 15 h při 4 °C. Čirá supernatantní tekutina se odstraní odsáním, sraženina se oddělí odstřeďováním při 4 °C a mechanicky se disperguje v 500 ml *vody destilované R* při 4 °C. Směs se 5 min protřepává a sraženina se oddělí odstřeďováním při 4 °C. Sraženina se mechanicky disperguje v 60 ml roztoku obsahujícího *chlorid sodný R* (9 g/l) a *citronan sodný R* (0,9 g/l) a pH směsi se upraví roztokem *hydroxidu sodného R* (10 g/l) na hodnotu 7,2 až 7,4. K usnadnění rozpouštění sraženiny se její částice rozmělní vhodným nástrojem a směs se filtruje přes filtr ze slinutého skla. Filtr a nástroj se promyjí 40 ml stejného roztoku chloridu sodného a citronanu sodného a zředí se jím na 100 ml. Tento roztok se lyofilizuje. Výtěžky jsou obvykle 6 g až 8 g euglobulinů z litru hovězí plazmy.

Zkouška způsobilosti. Roztoky použité v této zkoušce se připraví za pomoci tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,4 obsahujícího albumin hovězí R (30 g/l).

Do zkumavky o průměru 8 mm umístěné ve vodní lázni zahřáté na 37 °C se převede 0,2 ml referenčního přípravku urokinasy 100 m.j./ml a 0,1 ml roztoku *trombinu lidského R* 20 m.j./ml.

Směs se rychle smíchá s 0,5 ml roztoku obsahujícího 10 mg hovězích euglobulinů v 1 ml. Do 10 s se vytvoří sedlina. Zaznamená se čas mezi přidáním roztoku hovězích euglobulinů a rozpuštěním sedliny. Tento čas nepřevyšuje 15 min.

Uchovávají se chráněny před vlhkostí při 4 °C a jsou použitelné 1 rok.

Euglobuliny lidské R

Pro přípravu se použije čerstvá lidská krev odebraná do protisrážlivého roztoku (např. roztok citronanu sodného) nebo lidská krev pro transfuzi, která právě dosáhla expiračního data a uchovává se v plastových krevních obalech. Nepoužije se hemolyzovaná krev. Odstřeďuje se při 1500 g_n až 1800 g_n při 15 °C do získání supernatantní plazmy chudé na krevní destičky. Izo-skupiny plazmy mohou být smíchány.

K 1 litru plazmy se přidá 75 g *síranu barnatého R* a třepe se 30 min. Odstřeďuje se při nejméně 15 000 g_n při 15 °C, čirá supernatantní tekutina se oddělí, přidá se k ní 10 ml roztoku *aprotininu R* (0,2 mg/ml) a dobře se protřepe. Do nádoby o objemu nejméně 30 l v místnosti vychlazené na 4 °C se převede 25 l *vody destilované R* o teplotě 4 °C a přidá se 500 g pevného oxidu uhličitého. Ihned se za míchání přidá supernatantní tekutina získaná z plazmy. Vznikne bílá sraženina, která se nechá stát 10 h až 15 h při 4 °C. Čirá supernatantní tekutina se odstraní odsátím, sraženina se oddělí odstřeďováním při 4 °C a mechanicky se disperguje v 500 ml *vody destilované R* při 4 °C. Směs se 5 min protřepává a sraženina se oddělí odstřeďováním při 4 °C. Sraženina se mechanicky disperguje v 60 ml roztoku obsahujícího *chlorid sodný R* (9 g/l) a *citronan sodný R* (0,9 g/l) a pH směsi se upraví roztokem *hydroxidu sodného R* (10 g/l) na hodnotu 7,2 až 7,4. K usnadnění rozpouštění sraženiny se její částice rozmělní vhodným nástrojem a směs se filtruje přes filtr ze slinutého skla. Filtr i nástroj se promyjí 40 ml stejného roztoku chloridu sodného a citronanu sodného a zředí se jím na 100 ml. Tento roztok se lyofilizuje. Výtěžky jsou obvykle 6 g až 8 g euglobulinů z litru lidské plazmy.

Zkouška způsobilosti. Roztoky použité v této zkoušce se připraví za pomoci tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,4 obsahujícího albumin hovězí R (30 g/l).

Do zkumavky o průměru 8 mm umístěné ve vodní lázni zahřáté na 37 °C se převede 0,1 ml referenčního přípravku streptokinasy 10 m.j./ml a 0,1 ml roztoku *trombinu lidského R* 20 m.j./ml. Přidá se rychle 1 ml roztoku obsahujícího 10 mg lidských euglobulinů v 1 ml. Do 10 s se vytvoří sedlina. Zaznamená se čas mezi přidáním roztoku lidských euglobulinů a rozpuštěním sedliny. Tento čas nepřevyšuje 15 min.

Uchovávají se ve vzduchotěsných obalech při 4 °C a jsou použitelné 1 rok.

Faktor koagulační Xa hovězí R

CAS 9002-05-5

Je to enzym, který přeměňuje protrombin na trombin. Částečně přečištěný přípravek se získává z tekuté hovězí plazmy a může se připravit aktivací inaktivního enzymu faktoru X vhodným aktivátorem, jako je jed Russelovy zmije.

Lyofylizovaný přípravek se uchovává při -20 °C a zmrazený roztok při teplotě nižší než -20 °C.

Faktor koagulační Xa hovězí RS

Rozpustí se podle návodu výrobce a zředí se *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,4*. Jakákoliv změna absorbance roztoku, měřená při 405 nm (*2.2.25*) proti stejnému tlumivému roztoku jako kontrolní tekutině, je nejvýše 0,15 až 0,20/min.

Faktor koagulační V RS

Faktor koagulační V se může připravit následujícím postupem nebo jiným postupem, který vylučuje faktor VIII. Připraví se z čerstvé šťavelanové hovězí plazmy frakcionací při 4 °C s nasyceným roztokem *síranu amonného R*. Oddělí se frakce, která precipituje při nasycení 38 % až 50 %, obsahující faktor V bez významného znečištění faktorem VIII. Síran amonný se odstraní dialýzou a roztok se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9,0 g/l) tak, aby vznikl roztok obsahující 10 % až 20 % množství faktoru V přítomného v normální čerstvé lidské plazmě.

Stanovení obsahu. Připraví se dvě ředění koagulačního faktoru V v *tlumivém roztoku imidazolovém o pH 7,3*. První ředění obsahuje 1 objemový díl v 10 objemových dílech tlumivého roztoku a druhé ředění 1 objemový díl ve 20 objemových dílech tlumivého roztoku. Obě ředění se zkouší takto: 0,1 ml *plazmy substrátu prosté faktoru V RS*, 0,1 ml zkoušeného roztoku, 0,1 ml *zkoumadla tromboplastinového R* a 0,1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (3,5 g/l) se smíchají a měří se koagulační čas, tj. čas mezi přidáním roztoku chloridu vápenatého a první známkou tvorby fibrinu, kterou lze pozorovat vizuálně nebo pomocí vhodného přístroje.

Stejným způsobem se stanoví koagulační čas (dvojmo) čtyř ředění (*V/V*) normální lidské plazmy v *tlumivém roztoku imidazolovém o pH 7,3* obsahující 1 objemový díl na 10 objemových dílů (odpovídá 100 % faktoru V), 1 objemový díl na 50 objemových dílů (odpovídá 20 % faktoru V), 1 objemový díl na 100 objemových dílů (odpovídá 10 % faktoru V) a 1 objemový díl na 1000 objemových dílů (odpovídá 1 % faktoru V). Průměrné koagulační časy každého ředění lidské plazmy se vyznačí na logaritmickém papíru proti odpovídajícímu procentu faktoru V a interpolací se zjistí procenta koagulačního faktoru V pro dvě ředění sledovaného roztoku. Průměrná hodnota z těchto dvou výsledků udává procenta faktoru V ve zkoušeném roztoku.

Roztok se uchovává ve zmrzlém stavu při teplotě, která není vyšší než -20 °C.

Fehlingův roztok R

Viz *Vínan měďnatý RS*.

Fenanthren R

$C_{14}H_{10}$ M_r 178,2 CAS 85-01-8

Bílé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v etheru, mírně rozpustné v lihu 96%.
TT: asi 100 °C.

Fenanthroliniumchlorid R

$C_{12}H_9ClN_2 . H_2O$ M_r 234,7 CAS 3829-86-5

Monohydrát 1,10-fenanthroliniumchloridu

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.
TT: asi 215 °C, za rozkladu.

Fenazon R

Viz článek *Phenazonum*.

Fenchon R

$C_{10}H_{16}O$ M_r 152,2 CAS 7787-20-4

1,3,3-Trimethylbicyklo[2,2,1]heptan-2-on

Olejovitá kapalina, mísitelná s lihem 96% a s etherem, prakticky nerozpustná ve vodě.

n_D^{20}: asi 1,46.

$TV_{15\ mm}$: asi 66 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Foeniculi amari fructus* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Fenolftalein R

$C_{20}H_{14}O_4$ M_r 318,3 CAS 77-09-8

3,3′-Bis(4-hydroxyfenyl)ftalid

Bílý nebo nažloutlý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Fenolftalein RS

0,1 g *fenolftaleinu R* se rozpustí v 80 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,1 ml *fenolftaleinu RS* se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Roztok je bezbarvý a přidáním nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* vznikne růžové zbarvení.

Barevný přechod. pH 8,2 (bezbarvá) až pH 10,0 (červená).

Fenolftalein RS1

Roztok 10 g/l v *lihu 96% R.*

Fenol R

Viz článek *Phenolum.*

Fenoxybenzamoniumchlorid R

$C_{18}H_{23}Cl_2NO$ M_r 340,3

N-(2-chlorethyl)-N-(1-methyl-2-fenoxyethyl)benzylamoniumchlorid

Obsahuje 97,0 % až 103,0 % $C_{18}H_{23}Cl_2NO$, počítáno na vysušenou látku.

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 138 °C.

Ztráta sušením (2.2.32). Nejvýše 0,5 %, stanoví se sušením nad *oxidem fosforečným R*, při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa po dobu 24 h.

Stanovení obsahu. 0,500 g se rozpustí v 50,0 ml *chloroformu prostého ethanolu R* a třikrát se protřepe s 20 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS.* Vodná vrstva se odstraní, chloroformová vrstva se filtruje přes vatu. 5,0 ml filtrátu se zředí *chloroformem prostým ethanolu R* na 500,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku v maximu při 272 nm v uzavřené kyvetě.

Obsah $C_{18}H_{23}Cl_2NO$ se vypočítá za použití specifické absorbance, jejíž hodnota je 56,3.

Uchovává se chráněn před světlem.

Fenoxyethanol R

$C_8H_{10}O_2$ M_r 138,2 CAS 122-99-6

2-Fenoxyethanol

Čirá bezbarvá olejovitá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 1,11.

n_D^{20}: asi 1,537.

Teplota tuhnutí (2.2.18). Nejméně 12 °C.

Fenylalanin R

Viz článek *Phenylalaninum.*

p-Fenylendiamoniumdichlorid R

$C_6H_{10}Cl_2N_2$ M_r 181,1 CAS 615-28-1

Bílé nebo slabě zbarvené krystaly, červenající působením vzduchu, snadno rozpustné ve vodě, těžce rozpustné v lihu 96% a v etheru.

α-Fenylglycin R

$C_8H_9NO_2$ M_r 151,2 CAS 2835-06-5

Kyselina (*RS*)-2-amino-2-fenyloctová

Fenylhydrazin v kyselině sírové RS

65 mg *fenylhydraziniumchloridu R* předem překrystalizovaného v roztoku *lihu R* 85% (*V/V*) se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (80 + 170) a zředí se stejnou směsí na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Fenylhydraziniumchlorid R

$C_6H_9ClN_2$ M_r 144,6 CAS 59-88-1

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, na vzduchu hnědne, dobře rozpustný ve vodě a lihu 96%.

TT: asi 245 °C, za rozkladu.

Uchovává se chráněn před světlem.

Fenylhydraziniumchlorid RS

0,9 g *fenylhydraziniumchloridu R* se rozpustí v 50 ml *vody R*. Roztok se odbarví *aktivním uhlím R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 30 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* na 250 ml.

Ferocyfen R

$C_{26}H_{16}FeN_6$ M_r 468,3 CAS 14768-11-7

Železnatý komplex dikyanobis(1,10-fenantrolinu)

Fialově bronzový krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Uchovává se chráněn před světlem a vlhkostí.

Feroin RS

0,7 g *síranu železnatého R* a 1,76 g *fenanthroliniumchloridu R* se rozpustí v 70 ml *vody R* a zředí se jí na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS* se přidá 0,15 ml *oxidu osmičelého RS* a 0,1 ml roztoku feroinu. Po přidání 0,1 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* se změní barva z červené na světle modrou.

Fibrinogen R

Viz článek *Fibrinogenum humanum cryodesiccatum.*

Floroglucin R

$C_6H_6O_3 \cdot 2H_2O$ M_r 162,1 CAS 6099-90-7

Dihydrát 1,3,5-benzentriolu

Bílé nebo nažloutlé krystaly, těžce rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96%.

TT: asi 223 °C *(2.2.16)*

Fluoranthen R

$C_{16}H_{10}$ M_r 202,3 CAS 206-44-0

Benzo[*j*,*k*]fluoren

TT: 105 °C až 110 °C.

Fluordinitrobenzen R

$C_6H_3FN_2O_4$ M_r 186,1 CAS 70-34-8

1-Fluor-2,4-dinitrobenzen

Světle žluté krystaly, dobře rozpustné v etheru a v propylenglykolu.

TT: asi 29 °C.

Fluorescein R

$C_{20}H_{12}O_5$ M_r 332,3 CAS 2321-07-5

3′,6′-Dihydroxyspiro[isobenzofuran-1(3*H*),9′-[9*H*]xanthen]-3-on

Oranžově červený prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v teplém lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru, dobře rozpustný v alkalických roztocích. V roztoku vykazuje zelenou fluorescenci.

TT: asi 315 °C.

Fluorescein sodná sůl R

$C_{20}H_{10}Na_2O_5$ M_r 376,3 CAS 518-47-8

Colour Index 45350, Schultz 880

2-(6-Oxido-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoan sodný

Prášek červenooranžový, snadno rozpustný ve vodě, vodné roztoky intenzivně žlutozeleně fluoreskují.

Fluorid boritý R

BF_3 M_r 67,8 CAS 7637-07-2

Bezbarvý plyn.

Fluorid sodný R

Viz článek *Natrii fluoridum*.

1-Fluor-2-nitro-4-trifluormethylbenzen R

$C_7H_3F_4NO_2$ M_r 209,1 CAS 367-86-2

TT: asi 197 °C.

Formaldehyd R

Viz článek *Formaldehydi solutio 35%*.

Formaldehyd v kyselině sírové RS

2 ml *formaldehydu R* se smíchají se 100 ml *kyseliny sírové R*.

Formamid R

CH_3NO M_r 45,0 CAS 75-12-7

Čirá bezbarvá olejovitá hygroskopická kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%. Je hydrolyzován vodou.

TV: asi 103 °C, stanoví se při tlaku 2 kPa.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Formamid upravený RS

1,0 g *kyseliny amidosírové R* se disperguje ve 20,0 ml *formamidu R* obsahujícího 5 % *(V/V) vody R*.

Fosfolipidy R

Lidský nebo hovězí mozek se promyje, zbaví se blan a cév a ve vhodném přístroji se homogenizuje. Z homogenizátu se odváží 1000 g až 1300 g a stanoví se objem *(V)* v ml. Třikrát se extrahuje se čtyřnásobným objemem *acetonu R*. Po odfiltrování ve vakuu se zbytek suší po dobu 18 h při 37 °C. Zbytek se extrahuje dvakrát s 2 objemy směsi dvou objemových dílů *etheru petrolejového R2* a třech objemových dílů *etheru petrolejového R1*. Každý podíl se filtruje přes papírový filtr navlhčený směsí rozpouštědel. Spojené podíly se odpaří do sucha při 45 °C a tlaku nepřekračujícím 670 Pa. Zbytek se rozpustí v 0,2 objemu *etheru R* a roztok se nechá stát při 4 °C, až vznikne sraženina. Po odstřeďování se čirá supernatantní tekutina odpaří ve vakuu až na objem 100 ml z každého původně naváženého kilogramu homogenizátu a zváží se. Roztok se nechá stát při 4 °C (12 h až 24 h), až vznikne sraženina. Po odstřeďování se čirá supernatantní tekutina smíchá s pětinásobným množstvím *acetonu R*, odstřeďuje se, supernatantní tekutina se odstraní a sraženina se vysuší.

Uchovávají se ve vakuu v exsikátoru, chráněny před světlem.

Fosforečnan sodný dodekahydrát R

$Na_3PO_4 . 12H_2O$ M_r 380,1 CAS 10101-89-0

Tetraoxofosforečnan sodný dodekahydrát

Bezbarvé krystaly, snadno rozpustné ve vodě.

Fosfornan sodný R

$NaH_2PO_2 . H_2O$ M_r 106,0 CAS 10039-56-2

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky, hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Ftalanhydrid R

$C_8H_4O_3$ M_r 148,1 CAS 85-44-9

Isobenzofuran-1,3-dion

Obsahuje nejméně 99,0 % $C_8H_4O_3$.

Bílé lístky.

TT: 130 °C až 132 °C.

Stanovení obsahu. 2,000 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Ochladí se a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 74,05 mg $C_8H_4O_3$.

Ftalanhydrid RS

42 g *ftalanhydridu R* se rozpustí ve 300 ml *pyridinu bezvodého R*. Nechá se 16 h stát.

Uchovává se chráněn před světlem a je použitelný 1 týden.

Ftalazin R

$C_8H_6N_2$ M_r 130,1 CAS 253-52-1

Slabě žluté krystaly, snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96%, ethylacetatu a v methanolu, mírně rozpustné v etheru.

TT: 89 °C až 92 °C.

Ftaldialdehyd R

$C_8H_6O_2$ M_r 134,1 CAS 643-79-8

1,2-Benzendikarbaldehyd

Žlutý krystalický prášek.

TT: asi 55 °C.

Uchovává se chráněn před světlem a vzduchem.

Ftaleinpurpur R

$C_{32}H_{32}N_2O_{12} . nH_2O$ M_r bezvodého 637 CAS 2411-89-4

Kyselina *o*-kresolftalein-3′,3″-bis(methyleniminodioctová) hydrát

Žlutobílý až nahnědlý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%. Vyrábí se také ve formě sodné soli: žlutobílý až růžový prášek, dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkouška citlivosti. 10 mg látky se rozpustí v 1 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml. K 5 ml roztoku se přidá 95 ml *vody R*, 4 ml *amoniaku 26% R*, 50 ml *lihu 96% R* a 0,1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS*. Roztok je modro-fialový. Přidáním 0,15 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* se roztok odbarví.

Fuchsin zásaditý R

$C_{20}H_{20}ClN_3$ M_r 323,8 CAS 569-61-9

Fuchsin: Colour Index 42510, Schultz 780 (rosaniliniumchlorid)

$C_{19}H_{18}ClN_3$ M_r 329,9)

Parafuchsin: Colour Index 42500, Schultz 779 (pararosaliniumchlorid)

Je to směs rosaniliniumchloridu {(4-amino-3-methylfenyl)bis(4-aminofenyl)methyliumchlorid} a pararosaniliniumchloridu {tri(4-aminofenyl)methyliumchloridu}.

Krystalky se zelenobronzovým leskem, dobře rozpustné ve vodě a v lihu 96%.

V případě nutnosti se čistí tímto způsobem: 1,0 g se rozpustí v 250 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Roztok se nechá stát 2 h při pokojové teplotě, poté se zfiltruje, neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* a navíc se přidá 1 ml až 2 ml stejného roztoku. Sraženina se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (40), promyje se *vodou R*, rozpustí se v 70 ml *methanolu R* zahřátého k varu, přidá se 300 ml *vody R* 80 °C teplé a ochladí se na pokojovou teplotu. Krystalky se zfiltrují a vysuší se ve vakuu.

Uchovává se chráněn před světlem.

Fuchsin RS

Schiffův roztok

0,10 g *fuchsinu zásaditého R* se rozpustí v 60 ml *vody R*. Přidá se roztok obsahující 1,0 g *siřičitanu sodného bezvodého R* nebo 2,0 g *siřičitanu sodného R* v 10 ml *vody R*. Pomalu se za třepání přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* se na 100 ml. Nejméně 12 h se nechá stát chráněn před světlem. Roztok se odbarví přidáním *aktivního uhlí R* a zfiltruje. Jestliže je roztok zakalený, před použitím se zfiltruje. V případě, že se při skladování roztok fialově zbarví, odstraní se toto zbarvení *aktivním uhlím R*.

Zkouška citlivosti. K 1,0 ml se přidá 1,0 ml *vody R* a 0,1 ml *lihu 96% prostého aldehydů R*. Přidají se 0,2 ml roztoku obsahujícího 0,2 g/l formaldehydu (CH_2O; M_r30,02). Během 5 min se ve směsi objeví slabě růžové zbarvení.

Uchovává se chráněn před světlem.

Fuchsin RS1

K 1,0 g *fuchsinu zásaditého R* se přidá 100 ml *vody R*. Zahřeje se na 50 °C, pak při chladnutí se občas protřepe. Před použitím se nechá stát 48 h, protřepe se a pak se zfiltruje. Ke 4,0 ml filtrátu se přidá 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, smíchá se a zředí se *vodou R* na 100 ml. Před použitím se nechá nejméně 1 h stát.

Fukosa R

$C_6H_{12}O_5$ M_r 164,2 CAS 6696-41-9

6-Deoxy-L-galaktosa

Bílý prášek, dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

$[\alpha]_D^{20}$: asi -76°, měří se roztok (90,0 g/l) 24 h po přípravě.

TT: asi 140 °C.

Furfural R

$C_5H_4O_2$ M_r 96,1 CAS 98-01-1

2-Furaldehyd

Čirá bezbarvá až nahnědle žlutá olejovitá kapalina, mísitelná s 11 díly vody, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: 1,155 až 1,161.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 159 °C až 163 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Galaktosa R

$C_6H_{12}O_6$ M_r 180,2 CAS 59-23-4

D-(+)-Galaktosa

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě.

$[\alpha]_D^{20}$: +79 °C až +81°, měří se roztok (100 g/l) ve *vodě R* obsahující asi 0,05 % NH_3.

Geraniol R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,3 CAS 106-24-1

trans-3,7-Dimethyl-2,6-oktadien-1-ol

Bezbarvá čirá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,889.

n_D^{20}: asi 1,477.

TV: 231 °C až 232 °C.

Geranylacetat R

$C_{12}H_{20}O_2$ M_r 196,3 CAS 16409-44-2

(*E*)-3,7-Dimethylokta-2,6-dien-1-ylacetat

Bezbarvá nebo slabě žlutá kapalina, slabě páchne po růži a levanduli.

d_{25}^{25}: 0,896 až 0,913.

n_D^{15}: asi 1,463.

TV_{25}: asi 138 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) postupem uvedeným v článku *Auranti amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 99,0 % celkové plochy píků.

Gitoxin R

$C_{41}H_{64}O_{14}$ M_r 781 CAS 4562-36-1

3 -(O-2,6-Dideoxy- -D-*ribo*-hexopyranosyl-(1→4)-O-2,6-dideoxy- -D-*ribo*-hexopyranosyl-(1→4)- -2,6-dideoxy- -D-*ribo*-hexopyranosyloxy)-14,16 -dihydroxy-5 ,14 -kard-20(22)-enolit;glykosid *Digitalis purpurea* L.

Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a ve většině běžných organických rozpouštědel, dobře rozpustný v pyridinu.

$[\ ]_D^{20}$: +20° až +24°, měří se roztok (5 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R*.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Digitalis purpurea folium.* Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Glukosamoniumchlorid R

$C_6H_{14}ClNO_5$ M_r 215,6 CAS 66-84-2

D-Glukosamoniumchlorid

Krystaly, dobře rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v etheru.

$[\ ]_D^{20}$: +100°, po 30 min se snižuje na +47,5°, měří se roztok (100 g/l) ve *vodě R*.

Glukosa R

Viz článek *Glucosum.*

Glutaraldehyd R

$C_5H_8O_2$ M_r 100,1 CAS 111-30-8

Olejovitá kapalina, dobře rozpustná ve vodě.

n_D^{25}: asi 1,434.

TV: asi 188 °C.

Glycerol 85 % R

Viz článek *Glycerolum 85%.*

Glycerol R

Viz článek *Glycerolum.*

Glycin R

Viz článek *Glycinum.*

Glyoxal RS

CAS 107-22-2

Obsahuje asi 40 % glyoxalu.

Stanovení obsahu. Do kulaté skleněné baňky se zabroušenou zátkou se převede 1,000 g zkoušeného roztoku, 20 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (70 g/l) a 50 ml *vody R*. Směs se nechá stát

30 min a přidá se 1 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do změny červeného zbarvení na zelené. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 29,02 mg glyoxalu ($C_2H_2O_2$).

Glyoxalbishydroxyanil R

$C_{14}H_{12}N_2O_2$ M_r 240,3 CAS 1149-16-2

Glyoxal-bis(2-hydroxyanil)

Bílé krystaly, dobře rozpustné v horkém lihu 96%.

TT: asi 200 °C.

Gonadotropin choriový R

Viz článek *Gonadotropinum chorionicum*.

Gonadotropin sérum R

Viz článek *Gonadotropinum sericum equinum a.u.v.*

Guajakolová pryskyřice R

Pryskyřice se získává ze dřeva *Guajacum officinale* L. a *Guajacum sanctum* L.

Načervenale hnědé nebo nazelenale hnědé těžké křehké úlomky, na lomu lesklé.

Guajazulen R

$C_{15}H_{18}$ M_r 198,3 CAS 489-84-9

1,4-Dimethyl-7-isopropylazulen

Tmavě modré krystalky nebo modrá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s mastnými oleji, silicemi a s tekutým parafinem, mírně rozpustná v lihu 96%, dobře rozpustná v kyselině sírové (500 g/l) a 80% kyselině fosforečné, přičemž vzniká bezbarvý roztok.

TT: asi 30 °C.

Uchovává se chráněn před světlem a vzduchem.

Guanidiniumchlorid R

CH_6ClN_3 M_r 95,5 CAS 50-01-1

Krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Guanin R

$C_5H_5N_5O$ M_r 151,1 CAS 73-40-5

2-Amino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on

Bílý amorfní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se v roztocích amoniaku a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Harpagosid R

$C_{24}H_{30}O_{11}$ M_r 494,5

Bílý krystalický prášek, velmi hygroskopický, dobře rozpustný ve vodě a lihu 96%.

TT: 117 °C až 121 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsném obalu.

Helium pro chromatografii R

He A_r 4,003 CAS 7440-59-7

Obsahuje nejméně 99,995 % (*V/V*) He.

Hemoglobin R

CAS 9008-02-0

Dusík. 15 % až 16 %.

Železo. 0,2 % až 0,3 %.

Ztráta sušením (2.2.32). Nejvýše 2 %.

Síranový popel (2.4.14.). Nejvýše 1,5 %.

Hemoglobin RS

2,0 g *hemoglobinu R* se přenesou do 250ml baňky, přidá se 75 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS2* a míchá se do rozpuštění. pH roztoku se upraví pomocí *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* na 1,6 ± 0,1 (*2.2.3*). Roztok se přenese do odměrné baňky na 100 ml pomocí *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS2*. Přidá se 25 mg *thiomersalu R*. Připravuje se denně, uchovává se při (5 ± 3) °C a před použitím se znovu upraví pH na 1,6.

Uchovává se při 2 °C až 8 °C.

Heparin R

Viz článek *Heparinum natricum.*

Heptan R

C_7H_{16} M_r 100,2 CAS 142-82-5

Bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a s etherem.

d_{20}^{20}: 0,683 až 0,686.

n_D^{20}: 1,387 až 1,388.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 97 °C až 98 °C.

Heptansulfonan sodný R

$C_7H_{15}NaO_3S$ M_r 202,3 CAS 22767-50-6

Bílá nebo téměř bílá krystalická hmota, snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v methanolu.

Heptansulfonan sodný monohydrát R

$C_7H_{15}NaO_3S \cdot H_2O$ M_r 220,3

Počítáno na bezvodou látku, obsahuje nejméně 96 % sloučeniny $C_7H_{15}NaO_3S$.

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 8,0 %, stanoví se s 0,300 g.

Stanovení obsahu. 0,150 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,22 mg $C_7H_{15}NaO_3S$.

Hexadimethriniumdibromid R

$(C_{13}H_{30}Br_2N_2)_n$ CAS 28728-55-4

1,5-Dimethyl-1,5-diazaundekamethylenpolymethobromidi, poly(N,N,N′,N′-tetramethyl-N-trimethylen-hexamethylendiamoniumdibromid

Bílý amorfní prášek hygroskopický, dobře rozpustný ve vodě.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Hexahydroxoantimoničnan draselný R

$K[Sb(OH)_6]$ M_r 262,9 CAS 12208-13-8

Bílý krystalický prášek nebo bílé krystalky, je mírně rozpustný ve vodě.

Hexahydroxoantimoničnan draselný RS

2,0 g *hexahydroxoantimoničnanu draselného R* se rozpustí v 95 ml horké *vody R*. Rychle se ochladí a přidá se roztok obsahující 2,5 g *hydroxidu draselného R* v 50 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Nechá se stát 24 h. Přefiltruje se a zředí se *vodou R* na 150 ml.

Hexakosan R

$C_{26}H_{54}$ M_r 366,7 CAS 630-01-3

Bezbarvé nebo bílé destičky.

TT: asi 57 °C.

Hexakyanoželezitan draselný R

$K_3[Fe(CN)_6]$ M_r 329,3 CAS 13746-66-2

Červené krystalky, snadno rozpustné ve vodě.

Hexakyanoželezitan draselný RS

5 g *hexakyanoželezitanu draselného R* se propláchne malým množstvím *vody R*, potom se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Hexakyanoželeznatan draselný R

$K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ M_r 422,4 CAS 14459-95-1

Žluté průhledné krystalky, snadno rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Hexakyanoželeznatan draselný RS

Roztok 53 g/l.

Hexamethyldisilazan R

$C_6H_{19}NSi_2$ M_r 161,4 CAS 999-97-3

Čirá bezbarvá kapalina.
d_{20}^{20}: asi 0,78.
n_D^{20}: asi 1,408.
TV: asi 125 °C.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Hexamethylentetramin R

Viz *Methenamin R.*

Hexanitratoceričitan amonný R

$(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$ M_r 548,2 CAS 16774-21-3

Oranžově žlutý krystalický prášek nebo oranžové průsvitné krystalky, dobře rozpustné ve vodě.

Hexanitrokobaltitan sodný R

$Na_3[Co(NO_2)_6]$ M_r 403,9 CAS 13600-98-1

Oranžově žlutý prášek, snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Hexanitrokobaltitan sodný RS

Roztok 100 g/l. Připravuje se v čas potřeby.

Hexan R

C_6H_{14} M_r 86,2 CAS 110-54-3

n-Hexan

Bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a s etherem.
d_{20}^{20}: 0,659 až 0,663.
n_D^{20}: 1,375 až 1,376.
Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 67 °C až 69 °C.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následujícímu požadavku:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 97 % při 260 nm až 420 nm, měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Hexansulfonan sodný R

$C_6H_{13}NaO_3S$ M_r 188,2 CAS 2832-45-3

Bílý nebo téměř bílý prášek, snadno rozpustný ve vodě.

Hexylamin R

$C_6H_{15}N$ M_r 101,2 CAS 111-26-2

Bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru.
d_{20}^{20}: 0,766.
n_D^{20}: 1,418.
TV: 127 °C až 131 °C.

Histaminiumdichlorid R

Viz článek *Histamini dihydrochloridum*.

Histaminiumfosfat R

Viz článek *Histamini phosphas.*

Histamin RS

Roztok *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahující 0,1 μg/1 ml báze histaminu ve formě fosfatu nebo dichloridu.

Histidiniumchlorid R

Viz článek *Histidini hydrochloridum monohydricum.*

Hořčík R

Mg A_r 24,30 CAS 7439-95-4

Stříbrobílá páska, třísky, drát nebo šedý prášek.

Hovězí mozek sušený R

Čerstvý hovězí mozek zbavený cév a odblaněný se nařeže na malé kousky a odvodní se v *acetonu R*. 30 g hmoty se opakovaně roztírá v třence vždy se 75 ml *acetonu R,* až se po filtraci získá suchý prášek. Potom se suší 2 h při 37 °C až do vymizení pachu acetonu.

Hydraziniumsulfat R

$H_6N_2O_4S$ M_r 130,1 CAS 10034-93-2

Bezbarvé krystalky, mírně rozpustné ve studené vodě, dobře rozpustné ve vodě teplé 50 °C, snadno rozpustné ve vroucí vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Arsen (2.4.2). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce A pro arsen (1 μg/g).

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,1 %.

Hydrogenarseničnan sodný R

$Na_2HAsO_4 . 7H_2O$ M_r 312,0 CAS 10048-95-0

Heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného

Krystaly zvětrávající na teplém vzduchu, snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v glycerolu, těžce rozpustné v lihu 96%. Vodný roztok je alkalický na lakmus.

$\boldsymbol{d_{20}^{20}}$: asi 1,87.

TT: asi 57 °C při rychlém zahřívání.

Hydrogencitronan sodný R

$C_6H_6Na_2O_7 . 1,5H_2O$ M_r 263,1 CAS 144-33-4

Seskvihydrát disodné soli kyseliny 2-hydroxy-1,2,3-propan-trikarboxylové

Bílý prášek, rozpustný v méně než 2 dílech vody, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Hydrogenfosforečnan amonný R

$(NH_4)_2HPO_4$ M_r 132,1 CAS 7783-28-0

Bílé krystaly nebo granule, je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Hodnota pH roztoku (200 g/l) je asi 8.

Hydrogenfosforečnan draselný R

K_2HPO_4 M_r 174,2 CAS 7758-11-4

Bílý krystalický hygroskopický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Hydrogenfosforečnan sodný bezvodý R

Na_2HPO_4 M_r 142,0 CAS 7558-79-4

Bílý hygroskopický prášek.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát R

Viz článek *Natrii hydrogenophophas dihydricus.*

Hydrogenfosforečnan sodný R

Viz článek *Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus.*

Hydrogenfosforečnan sodný RS

Roztok 90 g/l.

Hydrogenftalan draselný R

$C_8H_5KO_4$ M_r 204,2 CAS 877-24-7

Draselná sůl kyseliny 1,2-benzendikarboxylové

Bílé krystaly, dobře rozpustné ve vodě, těžce rozpustné v lihu 96%.

Hydrogenftalan draselný 0,2 mol/l RS

Množství *hydrogenftalanu draselného R* odpovídající 40,84 g $C_8H_5KO_4$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Hydrogensíran draselný R

$KHSO_4$ M_r 136,2 CAS 7646-93-7

Bezbarvé průsvitné hygroskopické krystaly, snadno rozpustné ve vodě na roztok se silně kyselou reakcí.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Hydrogenuhličitan amonný R

NH_4HCO_3 M_r 79,1 CAS 1066-33-7

Obsahuje nejméně 99 % NH_4HCO_3.

Hydrogenuhličitan draselný R

$KHCO_3$ M_r 100,1 CAS 298-14-6

Průsvitné bezbarvé krystaly, snadno rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Hydrogenuhličitan draselný nasycený v methanolu RS

0,10 g *hydrogenuhličitanu draselného R* se rozpustí zahříváním na vodní lázni v 0,4 ml *vody R*. Přidá se 25 ml *methanolu R* a míchá se na vodní lázni do úplného rozpuštění látky. Používá se čerstvě připravený roztok.

Hydrogenuhličitan sodný R

Viz článek *Natrii hydrogenocarbonas*.

Hydrogenuhličitan sodný RS

Roztok 42 g/l.

Hydrogenvínan draselný R

$C_4H_5KO_6$ M_r 188,2 CAS 868-14-4

Draselná sůl kyseliny (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxy-1,4-butandiové

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé neprůhledné krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve vroucí vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Hydrochinon R

$C_6H_6O_2$ M_r 110,1 CAS 123-31-9

Benzen-1,4-diol

Drobné bezbarvé nebo bílé jehličky, tmavnoucí na vzduchu a na světle, dobře rozpustné ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 173 °C.

Uchovává se chráněn před světlem a vzduchem.

Hydrokortisonacetat R

Viz článek *Hydrocortisoni acetas*.

Hydroxid barnatý R

$Ba(OH)_2 . 8H_2O$ M_r 315,5 CAS 12230-71-6

Bezbarvé krystaly, dobře rozpustné ve vodě.

Hydroxid barnatý RS

47,3 g/l (asi 0,15 mol/l).

Hydroxid di(ethylendiamin)měďnatý 1 mol/l RS

Molární poměr ethylendiaminu k mědi je 2,00 ± 0,04.

Hydroxid draselný R

Viz článek *Kalii hydroxidum.*

Hydroxid draselný v lihu 2 mol/l RS

12 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v 10 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 100 ml.

Hydroxid draselný v lihu RS

3 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% prostým aldehydů R* na 100 ml. Dekantuje se čirý roztok. Roztok je téměř bezbarvý.

Hydroxid draselný v lihu RS1

6,6 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v 50 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 1000,0 ml.

Hydroxid draselný v lihu 0,5 mol/l RS

28 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí ve 100 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

Hydroxid lithný R

$LiOH . H_2O$ M_r 41,96 CAS 1310-66-3

Bílý zrnitý prášek silně alkalické reakce, absorbuje snadno vodu a oxid uhličitý, dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Hydroxid sodný R

Viz článek *Natrii hydroxidum.*

Hydroxid sodný koncentrovaný RS

42 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Hydroxid sodný RS

20,0 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Ověří se obsah titrací *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* za použití *oranže methylové RS* jako indikátoru a v případě potřeby se upraví na 200 g/l.

Hydroxid sodný zředěný RS

8,5 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Hydroxid sodný 4 mol/l RS

16,0 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Hydroxid sodný v methanolu RS

40 mg *hydroxidu sodného R* se rozpustí v 50 ml *vody R*. Ochladí se a přidá se 50 ml *methanolu R*.

Hydroxid tetraaminměďnatý RS

34,5 g síranu měďnatého R se rozpustí ve 100 ml vody R a za míchání se přidává po kapkách *amoniak 26% R*, dokud se vzniklá sraženina opět nerozpustí. Teplota se udržuje pod 20 °C a po kapkách se přidává za stálého míchání 30 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. Sraženina se filtruje přes filtr ze slinutého skla (40), promývá se *vodou R*, až je filtrát čirý, a potom se ke sraženině přidá 200 ml *amoniaku 26% R*. Znovu vzniklá sraženina se filtruje přes filtr ze slinutého skla a filtrace se opakuje pokud možno do rozpuštění.

Hydroxid vápenatý R

$Ca(OH)_2$ M_r 74,1 CAS 1305-62-0

Bílý prášek, téměř zcela rozpustný v 600 dílech vody.

Hydroxid vápenatý RS

Čerstvě připravený nasycený roztok.

Hydroxychinolin R

C_9H_7NO M_r 145,2 CAS 148-24-3

8-Hydroxychinolin

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a ve zředěných minerálních kyselinách.

TT: asi 75 °C.

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,05 %.

Hydroxylamoniumchlorid R

H_4ClNO M_r 69,5 CAS 5470-11-1

Bílý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Hydroxylamoniumchlorid RS2

2,5 g *hydroxylamoniumchloridu R* se rozpustí ve 4,5 ml horké *vody R* a přidá se 40 ml *lihu 96% R* a 0,4 ml *modře bromfenolové RS2*. Přidává se *hydroxid draselný v lihu 0,5 mol/l RS* do vzniku zelenavě žlutého zbarvení a zředí se *lihem 96% R* na 50,0 ml.

Hydroxylamoniumchlorid alkalický RS

Stejné objemové díly roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (139 g/l) a roztoku *hydroxidu sodného R* (150 g/l) se smíchají bezprostředně před použitím.

Hydroxylamoniumchlorid alkalický RS1

Roztok A. 12,5 g *hydroxylamoniumchloridu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Roztok B. 12,5 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Bezprostředně před použitím se smíchají stejné díly roztoku A a roztoku B.

Hydroxylamoniumchlorid v lihu RS

3,5 g *hydroxylamoniumchloridu R* se rozpustí v 95 ml roztoku *lihu R* 60% (*V/V*), přidá se 0,5 ml roztoku *oranže methylové sodné soli R* (2 g/l) v *lihu R* 60% (*V/V*) a dostatečné množství *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l RS*, aby vzniklo čistě žluté zbarvení. Zředí se roztokem *lihu R* 60% *(V/V)* na 100 ml.

Hydroxymethylfurfural R

$C_6H_6O_3$ M_r 126,1 CAS 67-47-0

5-Hydroxymethylfurfural; 5-hydroxymethyl-2-furalaldehyd

Jehličkovité krystalky, snadno rozpustné ve vodě, v acetonu a v lihu 96%, dobře rozpustné v etheru.

TT: asi 32 °C.

Hyoscyaminiumsulfat R

Viz článek *Hyoscyamini sulfas.*

Hyperosid R

$C_{21}H_{20}O_{12}$ M_r 464,4

2-(3,4-Dihydroxyfenyl)-3-β-D-galaktopyranosyloxy-5,7-dihydroxychromen-4-on

Slabě žluté jehlice, dobře rozpustné v methanolu.

$[\alpha]_D^{20}$: -8,3°; měří se roztok (2 g/l) v *pyridinu R.*

TT: asi 240 °C, za rozkladu.

Roztok v *methanolu R* vykazuje dvě absorpční maxima (*2.2.25*), při 259 nm a 364 nm.

Hypoxanthin R

$C_5H_4N_4O$ M_r 136,1 CAS 68-94-0

1*H*-Purin-6-on

Bílý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný ve vroucí vodě, dobře rozpustný ve zředěných kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. Rozkládá se bez tání při asi 150 °C.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Mercaptopurinum*. Na získaném chromatogramu je pouze jedna hlavní skvrna.

Chinhydron R

$C_{12}H_{10}O_4$ M_r 218,2 CAS 106-34-3

Je to ekvimolární komplex 1,4-benzochinonu a 1,4-hydrochinonu.

Tmavě zelené lesklé krystaly nebo krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v horké vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, v amoniaku 26% a v etheru.

TT: asi 170 °C.

Chinidin R

$C_{20}H_{24}N_2O_2$ M_r 324,4 CAS 56-54-2

(*S*)-(6-Methoxy-4-chinolyl)[(2*R*,4*S*,5*R*)-5-vinyl-2-chinuklidinyl]-methanol

Bílé krystaly, velmi těžce rozpustné ve vodě, mírně rozpustné v lihu 96%, těžce rozpustné v etheru a v methanolu.
$[\alpha]_D^{20}$: asi +260°, měří se roztok v *ethanolu R* (10 g/l).
TT: asi 172 °C.
Uchovává se chráněn před světlem.

Chininiumchlorid R

Viz článek *Quinini hydrochloridum*.

Chininiumsulfat R

Viz článek *Quinini sulfas.*

Chinin R

$C_{20}H_{24}N_2O_2$ M_r 324,4 CAS 130-95-0

(*S*)-(6-Methoxy-4-chinolyl)[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-vinyl-2-chinuklidinyl]-methanol.
Bílý mikrokrystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný ve vroucí vodě, velmi snadno rozpustný v ethanolu, dobře rozpustný v etheru.
$[\alpha]_D^{20}$: asi -167°, měří se roztok v *ethanolu R* (10 g/l).
TT: asi 175 °C.
Uchovává se chráněn před světlem.

Chloracetanilid R

C_8H_8ClNO M_r 169,6 CAS 539-03-7

4′-Chloracetanilid
Krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.
TT: asi 178 °C.

Chloralhydrát R

Viz článek *Chlorali hydras*.

Chloralhydrát RS

80 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*.

Chloramin T R

Viz článek *Tosylchloramidum natricum*.

Chloramin T RS

Roztok 20 g/l. Připravuje se v čas potřeby.

Chloramin T RS1

Roztok 0,1 g/l. Připravuje se v čas potřeby.

Chloramin T RS2

Roztok 0,2 g/l. Připravuje se v čas potřeby.

Chloranilin R

C_6H_6ClN M_r 127,6 CAS 106-47-8

4-Chloranilin

Krystaly dobře rozpustné v horké vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 71 °C.

4-Chlorbenzensulfonamid R

$C_6H_6ClNO_2S$ M_r 191,6 CAS 98-64-6

Bílý prášek.

TT: asi 145 °C.

Chlorbutanol R

Viz článek *Chlorobutanolum.*

Chlorečnan draselný R

$KClO_3$ M_r 122,6 CAS 3811-04-9

Bílý prášek, krystaly nebo granule. Je dobře rozpustný ve vodě.

2-Chlorethanol R

C_2H_5ClO M_r 80,5 CAS 107-07-3

Bezbarvá kapalina, dobře rozpustná v lihu 96 %.

d_{20}^{20}: asi 1,197.

n_D^{20}: asi 1,442.

TV: asi 130 °C.

TT: asi -89 °C.

2-Chlorethanol RS

125 mg *2-chlorethanolu R* se rozpustí v *2-propanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *2-propanolem R* na 50,0 ml.

(2-Chlorethyl)diethylamoniumchlorid R

$C_6H_{15}Cl_2N$ M_r 172,1 CAS 869-24-9

Bílý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, snadno rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v hexanu.

TT: asi 211 °C.

Chlorfenol R

C_6H_5ClO M_r 128,6 CAS 106-48-9

4-Chlorfenol

Bezbarvé nebo téměř bezbarvé krystaly, těžce rozpustné ve vodě, velmi snadno rozpustné v lihu 96%, v etheru a v roztocích alkalických hydroxidů.
TT: asi 42 °C.

Chlorid amonný R

Viz článek *Ammonii chloridum.*

Chlorid amonný RS

Roztok 107 g/l.

Chlorid antimonitý R

$SbCl_3$ M_r 228,1 CAS 10025-91-9

Bezbarvé krystaly nebo průsvitná krystalická hmota. Je hygroskopický, snadno rozpustný v lihu 96%. Látka je vodou hydrolyzována.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před vlhkostí.

Chlorid antimonitý RS

30 g *chloridu antimonitého R* se rychle dvakrát opláchne 15 ml *chloroformu prostého ethanolu R*, promývací tekutina se dekantuje a promyté krystaly se ihned rozpustí za mírného zahřátí ve 100 ml *chloroformu prostého ethanolu R.*

Uchovává se s několika gramy *síranu sodného bezvodého R.*

Chlorid antimonitý RS1

Roztok I. 110 g *chloridu antimonitého RS* se rozpustí ve 400 ml *dichlorethanu R.* Přidají se 2,0 g *oxidu hlinitého bezvodého R*, promíchá se a filtruje se přes filtr ze slinutého skla (40). Zředí se *dichlorethanem R* na 500,0 ml a promíchá se. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 500 nm v 20mm vrstvě není větší než 0,07.
Roztok II. Za odtahu se smíchá 100 ml čerstvě předestilovaného *acetylchloridu R* a 400 ml *dichlorethanu R.* Uchovává se v chladu.

90 ml roztoku I a 10 ml roztoku II se smíchá.

Uchovává se v hnědých skleněných lahvích se zabroušenou zátkou a je použitelný 7 dní; zbarvené zkoumadlo se nepoužije.

Chlorid barnatý R

$BaCl_2 . 2H_2O$ M_r 244,3 CAS 10326-27-9

Bezbarvé krystalky, snadno rozpustné ve vodě, těžce rozpustné v lihu 96%.

Chlorid barnatý RS1

Roztok 61,0 g/l.

Chlorid barnatý RS2

Roztok 36,5 g/l.

Chlorid cesný R

$CsCl$ M_r 168,4 CAS 7647-17-8

Bílý prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v acetonu.

Chlorid cínatý R

$SnCl_2 . 2H_2O$ M_r 225,6 CAS 10025-69-1

Obsahuje nejméně 97,0 % $SnCl_2 . 2H_2O$.

Bezbarvé krystalky, velmi snadno rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96 %, v kyselině octové ledové, kyselině chlorovodíkové a kyselině chlorovodíkové zředěné.

Stanovení obsahu. Do baňky se zabroušenou zátkou se naváží 0,500 g, rozpustí se v 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a přidá se 10 ml *vody R* a 5 ml *chloroformu R*. Okamžitě se titruje *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS* až do odbarvení chloroformové vrstvy.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 22,56 mg $SnCl_2 . 2H_2O$.

Chlorid cínatý RS

20 g *cínu R* se zahřívá s 85 ml *kyseliny chlorovodíkové R* až do skončení vyvíjení vodíku a nechá se vychladnout.

Uchovává se nad *cínem R*, chráněný před vzduchem.

Chlorid cínatý RS1

V čas potřeby se smíchá 1 objemový díl *chloridu cínatého RS* s 10 objemovými díly *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.*

Chlorid cínatý RS2

K 8 g *chloridu cínatého R* se přidá 100 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (200 ml/l) a třepe se do rozpuštění, v případě potřeby se zahřívá na vodní lázni při 50 °C. 15 min se probublává proudem *dusíku R*. Připravuje se v čas potřeby.

Chlorid draselný R

Viz článek *Kalii chloridum.*

Při použití v infračervené spektrofotometrii (*2.2.24*) vyhovuje následující zkoušce:

2 mm silný výlisek (tableta) látky sušený 1 h při 250 °C má prakticky rovnou základní linii v oblasti 4000 cm^{-1} až 620 cm^{-1}. Nad touto linií nevykazuje žádná maxima s absorbancí vyšší než 0,02 s výjimkou maxima vody při 3440 cm^{-1} a 1630 cm^{-1}.

Chlorid draselný 0,1 mol/l RS

Roztok obsahuje *chlorid draselný R* v množství odpovídajícím 7,46 g KCl v 1000,0 ml.

Chlorid hlinitý R

$AlCl_3 . 6H_2O$ M_r 241,4 CAS 7784-13-6

Chlorid hlinitý hexahydrát

Obsahuje nejméně 98,0 % $AlCl_3 . 6H_2O$.

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek, hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Chlorid hlinitý RS

65,0 g *chloridu hlinitého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Po přidání 0,5 g *aktivního uhlí R* se 10 min míchá, potom se filtruje a pH filtrátu se za stálého míchání upraví roztokem *hydroxidu sodného R* (10 g/l) (asi 60 ml) na hodnotu pH 1,5.

Chlorid hlinitý RS1

2,0 g *chloridu hlinitého R* se rozpustí ve 100 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 5% (*V/V*) v *methanolu R*.

Chlorid hořečnatý R

Viz článek *Magnesii chloridum.*

Chlorid kobaltnatý R

$CoCl_2 . 6H_2O$ M_r 237,9 CAS 7791-13-1

Červený krystalický prášek nebo tmavě červené krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Chlorid lithný R

LiCl M_r 42,39 CAS 7447-41-8

Krystalický prášek, granule nebo krychlové rozplývavé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%. Vodný roztok je neutrální nebo slabě alkalický.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Chlorid měďnatý R

$CuCl_2 . 2H_2O$ M_r 170,5 CAS 10125-13-0

Zelenomodrý prášek nebo krystaly, rozpadající se ve vlhkém vzduchu, zvětrávající v suchém vzduchu. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v methanolu, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v etheru.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Chlorid nikelnatý R

$NiCl_2$ M_r 129,6 CAS 7718-54-9

Bezvodý chlorid nikelnatý

Žlutý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%. Sublimuje za nepřítomnosti vzduchu a rychle absorbuje amoniak. Vodný roztok je kyselý.

Chlorid palladnatý R

$PdCl_2$ M_r 177,3 CAS 7647-10-1

Červené krystaly.

TT: 678 °C až 680 °C.

Chlorid palladnatý RS

1,0 g *chloridu palladnatého R* se rozpustí v 10,0 ml teplé *kyseliny chlorovodíkové R*. Roztok se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody R* na 250,0 ml. Tento roztok se v čas potřeby zředí dvěma objemovými díly *vody R*.

Chlorid rtuťnatý R

Viz článek *Hydrargyri dichloridum.*

Chlorid rtuťnatý RS

Roztok 54,0 g/l.

Chlorid sodný R

Viz článek *Natrii chloridum.*

Chlorid sodný RS

Roztok 200 g/l.

Chlorid titanitý R

$TiCl_3$ M_r 154,3 CAS 7705-07-9

Červenofialové rozpadající se krystalky, dobře rozpustné ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustné v etheru.
TT: asi 440 °C.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Chlorid titanitý RS

150 g/l v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (100 g/l HCl).
d_{20}^{20}: asi 1,19.

Chlorid uhličitý R

CCl_4 M_r 153,8 CAS 56-23-5

Tetrachlormethan
Čirá bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.
d_{20}^{20}: 1,595 až 1,598.
TV: 76 °C až 77 °C.

Chlorid vápenatý R

Viz článek *Calcii chloridum*.

Chlorid vápenatý bezvodý R

$CaCl_2$ M_r 111,0 CAS 10043-52-4

Obsahuje nejméně 98,0 % $CaCl_2$, počítáno na vysušenou látku.

Bílá rozpadávající se zrnka, velmi snadno rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a methanolu.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %, suší se při 200 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před vlhkostí.

Chlorid vápenatý R1

$CaCl_2 . 4H_2O$ M_r 183,1

Obsahuje nejvýše 0,5 μg Fe/g.

Chlorid vápenatý RS

Roztok 73,5 g/l.

Chlorid vápenatý 0,01 mol/l RS

0,147 g *chloridu vápenatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Chlorid vápenatý 0,02 mol/l RS

2,94 g *chloridu vápenatého R* se rozpustí v 900 ml *vody R*, pH roztoku se upraví na hodnotu 6,0 až 6,2 a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Uchovává se při 2 °C až 8 °C.

Chlorid zinečnatý R

Viz článek *Zinci chloridum.*

Chlorid zinečnatý v kyselině mravenčí RS

20 g *chloridu zinečnatého R* se rozpustí v 80 g roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (850 g/l).

Chlorid zinečnatý s jodem RS

20 g *chloridu zinečnatého R* a 6,5 g *jodidu draselného R* se rozpustí v 10,5 ml *vody R*, přidá se 0,5 g *jodu R* a míchá se 15 min. V případě potřeby se filtruje.

Uchovává se chráněn před světlem.

Chlorid železitý R

$FeCl_3 . 6H_2O$ M_r 270,3 CAS 10025-77-1

Žlutooranžová nebo nahnědlá krystalická rozplývající se hmota, velmi snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru. Na světle jsou chlorid železitý a jeho roztoky částečně redukovány.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Chlorid železitý RS1

Roztok 105 g/l.

Chlorid železitý RS2

Roztok 13 g/l.

Chlorid-oxid zirkoničitý R

CAS 15461-27-5

Je to zásaditá sůl odpovídající přibližně vzorci $ZrCl_2O . 8H_2O$.
Obsahuje nejméně 96,0 % $ZrCl_2 . 8H_2O$.
Bílý krystalický prášek nebo bílé krystalky, je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Stanovení obsahu. 0,600 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny dusičné R* a 50 ml *vody R*, přidá se 50,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 3 ml *dibutylftalatu R* a zamíchá se. Titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru do červenožlutého zbarvení.
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,11 mg $ZrCl_2O . 8H_2O$.

Chloristan holmitý RS

Roztok *oxidu holmitého R* (40 g/l) v roztoku *kyseliny chloristé R* (141 g/l $HClO_4$).

Chloristan sodný R

$NaClO_4 . H_2O$ M_r 140,5 CAS 7791-07-3

Obsahuje nejméně 99,0 % $NaClO_4 . H_2O$.
Bílé rozpadající se krystalky, velmi snadno rozpustné ve vodě.
Uchovává se v dobře uzavřených obalech.

Chlornan sodný RS

Obsahuje 25 g/l až 30 g/l aktivního chloru. Nažloutlá kapalina alkalické reakce.

Stanovení obsahu. 10,0 ml se zředí *vodou R* na 100,0 ml, z tohoto roztoku se 10,0 ml přenese do kuželové baňky obsahující 50 ml *vody R*, 1,0 g *jodidu draselného R* a 12,5 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.
1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,546 mg aktivního chloru.
Uchovává se chráněn před světlem.

Chlornitroanilin R

$C_6H_5ClN_2O_2$ M_r 172,6 CAS121-87-9

2-Chlor-4-nitroanilin
Žlutý krystalický prášek, snadno rozpustný v methanolu.
TT: asi 107 °C.
Uchovává se chráněn před světlem.

Chloroform R

$CHCl_3$ M_r 119,4 CAS 67-66-3

Trichlormethan
Čirá bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.

d_{20}^{20}: 1,475 až 1,481.
TV: asi 60 °C.

Obsahuje 0,4 % až 1,0 % ethanolu.

Ethanol. K 1,00 g (*m*) v kuželové baňce se zabroušenou zátkou se přidá 15,0 ml *dichromanu draselného v kyselině dusičné RS*, nádoba se uzavře, 2 min se silně třepe a 15 min se nechá stát. Přidá se 100 ml *vody R* a 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l). Po 2 min se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu R* jako indikátoru do vzniku světle zelené barvy (n_1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*). Současně se provede slepá zkouška (n_2 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*). Obsah ethanolu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(n_2 - n_1) \cdot 0{,}115}{m} .$$

Chloroform okyselený R

K 100 ml *chloroformu R* se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Protřepe se, nechá se stát, až se oddělí dvě vrstvy. Použije se spodní vrstva.

Chloroform prostý ethanolu R

200 ml *chloroformu R* se třepe 4krát se 100 ml *vody R*. Suší se 24 h nad 20 g *síranu sodného bezvodého R* a zfiltruje se. Filtrát se destiluje nad 10 g *síranu sodného bezvodého R*. Prvních 20 ml destilátu se odstraní. Připravuje se v čas potřeby.

Chloroform stabilizovaný amylenem R

Čirá bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.

Voda. Nejvýše 0,05 %.

Zbytek po odpaření. Nejvýše 0,001 %.

Transmitance (2.2.25). Nejméně 50 % při 255 nm, nejméně 80 % při 260 nm, nejméně 98 % při 300 nm, měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Stanovení obsahu. Nejméně 99,8 % $CHCl_3$; stanoví se plynovou chromatografií.

3-Chlorpropan-1,2-diol R

$C_3H_7ClO_2$ M_r 110,5 CAS 96-24-2

Bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, lihu 96% a v etheru.
d_{20}^{20}: asi 1,322.
n_D^{20}: asi 1,480.
TV: asi 213 °C.

Chlortrimethylsilan R

C_3H_9ClSi M_r 108,6 CAS 75-77-4

Čirá bezbarvá, na vzduchu dýmající kapalina.
d_{20}^{20}: asi 0,86.
n_D^{20}: asi 1,388.
TV: asi 57 °C.

Cholesterol R

Viz článek *Cholesterolum.*

Choliniumchlorid R

$C_5H_{14}ClNO$ M_r 139,6 CAS 67-48-1

(2-Hydroxyethyl)trimethylamoniumchlorid

Rozpadající se krystaly, velmi snadno rozpustné ve vodě a v lihu 96%.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Suxamethonii chloridum*, nanáší se 5 μl roztoku (0,2 g/l) v *methanolu R.* Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Chroman draselný R

K_2CrO_4 M_r 194,2 CAS 7789-00-6

Žluté krystalky, snadno rozpustné ve vodě.

Chroman draselný RS

Roztok 50 g/l.

Chromazurol S R

$C_{23}H_{13}Cl_2Na_3O_9S$ M_r 605 CAS 1667-99-8

Colour Index 43825, Schultz 841

Trisodná sůl kyseliny 5-[(3-karboxy-5-methyl-4-oxo-2,5-cyklohexadien-1-yliden)-(2,6-dichlor-3--sulfofenyl)methyl]-2-hydroxy-3-methylbenzoové

Hnědočerný prášek, dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Chromoforový substrát R1

N-α-Benzoylkarbonyl-D-arginyl-L-arginin-*p*-nitroanilid dihydrochlorid se rozpustí ve *vodě R* na roztok o koncentraci 0,003 mol/l. Před použitím se zředí *tlumivým roztokem trometamolovým s edetanem disodným o pH 8,4* na koncentraci 0,0005 mol/l.

Chromoforový substrát R2

D-Fenylalanyl-piperazin-arginin-*p*-nitroanilid dihydrochlorid se rozpustí ve vodě na roztok o koncentraci 0,003 mol/l. Před použitím se zředí *tlumivým roztokem trometamolovým s edetanem disodným o pH 8,4* na koncentraci 0,0005 mol/l.

Chromotropin 2 B R

$C_{16}H_9N_3Na_2O_{10}S_2$ M_r 513,4 CAS 548-80-1

Colour Index 16575, Schultz 67

Disodná sůl kyseliny 4,5-dihydroxy-3-(4-nitrofenylazo)-2,7-naftalendisulfonové

Červenohnědý prášek, dobře rozpustný ve vodě za vzniku žlutočerveného roztoku, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Chromotropin 2 B RS

Roztok (0,05 g/l) v *kyselině sírové R*.

Imidazol R

$C_3H_4N_2$ M_r 68,1 CAS 288-32-4

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.
TT: asi 90 °C.

Iminodibenzyl R

$C_{14}H_{13}N$ M_r 195,3 CAS 494-19-9

10,11-Dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin
Slabě žlutý krystalický prášek, snadno rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný ve vodě.
TT: asi 106 °C.

Indigokarmín R

$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ M_r 466,3 CAS 860-22-0

Colour Index 73015, Schultz 1309, E 132
Disodná sůl kyseliny 3,3′-dioxo-2,2′-bisindolinyliden-5,5′disulfonové; disodná sůl kyseliny 5,5′--indigodisulfonové; E 132
Obsahuje obvykle chlorid sodný.
Modrý nebo fialově modrý prášek nebo modré granule s měděným leskem, mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Z vodných roztoků vypadává indigokarmín přídavkem chloridu sodného.

Indigokarmín RS

Ke směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 990 ml roztoku *kyseliny sírové prosté dusičnanů R* (200 g/l) se přidá 0,20 g *indigokarmínu R*.
Roztok vyhovuje následující zkoušce: k 10 ml roztoku se přidá roztok 1,0 mg *dusičnanu draselného R* v 10 ml *vody R* a rychle se přidá 20 ml *kyseliny sírové prosté dusičnanů R* a zahřeje se k varu. Modré zbarvení v průběhu 1 min zmizí.

Indigokarmín RS1

4 g *indigokarmínu R* se rozpustí v asi 900 ml *vody R* přidávané po částech, přidají se 2 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

Standardizace. Do 100ml kuželové baňky se širokým hrdlem se převede 10,0 ml základního *roztoku dusičnanů (100 μg NO_3 /ml)*, 10 ml *vody R*, 0,05 ml *indigokarmínu RS1* a potom se opatrně najednou přidá 30 ml *kyseliny sírové R*. Roztok se ihned titruje *indigokarmínem RS1* do vzniku stálého modrého zbarvení.
Spotřebovaný počet mililitrů (*n*) odpovídá 1 mg NO_3.

Indikátor směsný BMF RS

0,10 g *modři bromthymolové R*, 0,020 g *červeně methylové R* a 0,20 g *fenolftaleinu R* se rozpustí v *lihu 96% R*, zředí se jím na 100 ml a zfiltruje se.

Indometacin R

Viz článek *Indometacinum.*

Isatin R

$C_8H_5NO_2$ M_r 147,1 CAS 91-56-5

Indolin-2,3-dion

Malé žlutočervené krystalky, těžce rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v horké vodě, v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustné v roztocích alkalických hydroxidů za vzniku fialového zbarvení, které se stáním mění na žluté.

TT: asi 200 °C, s částečnou sublimací.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %.

Isoamylalkohol R

$C_5H_{12}O$ M_r 88,1 CAS 123-51-3

3-Methyl-1-butanol

Bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

TV: asi 130 °C.

Isobutanol R

$C_4H_{10}O$ M_r 74,1 CAS 78-83-1

2-Methyl-1-propanol

Čirá bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,80.

n_D^{15}: 1,397 až 1,399.

TV: asi 107 °C.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 96 % předestiluje při 107 °C až 109 °C.

Isobutylmethylketon R

$C_6H_{12}O$ M_r 100,2 CAS 108-10-1

4-Methyl-2-pentanon

Čirá bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s většinou organických rozpouštědel.

d_{20}^{20}: asi 0,80.

TV: asi 115 °C.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Destiluje se 100 ml. Rozmezí teploty destilace od 1 ml do 95 ml destilátu nepřesahuje 4,0 °C.

Zbytek po odpaření. Nejvýše 0,01 %, stanoví se odpařováním na vodní lázni a sušením při 100 °C až 105 °C.

Isobutylmethylketon R1

50 ml čerstvě předestilovaného *isobutylmethylketonu R* se 1 min třepe s 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Fáze se nechají oddělit a spodní fáze se odstraní. Připravuje se v čas potřeby.

Isokvercitrin R

$C_{21}H_{20}O_{12}$ M_r 464,4 CAS 21637-25-2

Kvercetin-3-glukosid

Žluté jehličkovité krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v methanolu a ethanolu.

TT: 225 °C až 227 °C.

Absorbance. Roztok (40 mg/l) v *methanolu R* vykazuje maxima při 257 nm a 369 nm.

Isomenthol R

$C_{10}H_{20}O$ M_r 156,3 CAS 23283-97-8

(+)-Isomenthol: (1*S*,2*R*,5*R*)-2-isopropyl-5-methylcyklohexanol

Bezbarvé krystalky, prakticky nerozpustné ve vodě, velmi snadno rozpustné v lihu 96 % a etheru.

$[\alpha]_D^{20}$: asi +24°, měří se roztok (100 g/l) v *lihu 96% R*.

TT: asi 80 °C

TV: asi 218 °C.

(±)-Isomenthol: směs stejných dílů (1*S*,2*R*,5*R*)- a (1*R*,2*S*,5*S*)-2-isopropyl-5-methylcyklohexanolu)

TT: asi 53 °C.

TV: asi 218 °C.

Isomenthon R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,2

(1*R*)-*cis*-*p*-Menthan-3-on; (1*R*)-*cis*-2-isopropyl-5-methylcyklohexanon

Obsahuje proměnlivá množství menthonu.

Bezbarvá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 0,904.

n_D^{20}: asi 1,453.

$[\alpha]_D^{20}$: +93,2°.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Zkouší se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 80,0 % z celkové plochy píků.

4-Isopropylfenol R

$C_9H_{12}O$ M_r 136,2 CAS 99-89-8

Obsahuje nejméně 98 % $C_9H_{12}O$.

TV: asi 212 °C.

TT: 59 °C až 61 °C.

Isopropylmyristat R

Viz článek *Isopropylis myristas*.

Jod R

Viz článek *Iodum*.

Jod RS

2 g *jodu R* a 4 g *jodidu draselného R* se rozpustí v 10,0 ml *vody R*. Po úplném rozpuštění se zředí *vodou R* na 100 ml.

Jod RS1

K 10,0 ml *jodu 0,05 mol/l RS* se přidá 0,6 g *jodidu draselného R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Jod RS2

K 10,0 ml *jodu 0,05 mol/l RS* se přidá 0,6 g *jodidu draselného R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Jod RS3

2,0 ml *jodu RS1* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Jod RS4

14 g *jodu R* se rozpustí ve 100 ml roztoku *jodidu draselného R* (400 g/l), přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.
Uchovává se chráněn před světlem.

Jod v chloroformu RS

Roztok 5,0 g/l v *chloroformu R*.
Uchovává se chráněn před světlem.

Jod v lihu RS

Roztok 10,0 g/l v *lihu 96% R*.
Uchovává se chráněn před světlem.

Jodethan R

C_2H_5I M_r 155,9 CAS 75-03-6

Bezbarvá až slabě nažloutlá kapalina, tmavnoucí působením vzduchu a světla, mísitelná s lihem 96% a většinou organických rozpouštědel.
$\boldsymbol{d_{20}^{20}}$: asi 1,95.
$\boldsymbol{n_D^{20}}$: asi 1,513.
TV: asi 72 °C.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Jodičnan draselný R

KIO_3 M_r 214,0 CAS 7758-05-6

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě.

Jodid draselný R

Viz článek *Kalii iodidum*.

Jodid draselný RS

Roztok 166,0 g/l.

Jodid draselný nasycený RS

Nasycený roztok *jodidu draselného R* ve *vodě prosté oxidu uhličitého R.* Obsahuje nerozpuštěné krystaly.

Zkouška způsobilosti. 0,5 ml se přidá ke 30 ml směsi objemových dílů *chloroformu R* a *kyseliny octové R* (2 + 3) a dále se přidá 0,1 ml *škrobu RS.* K odstranění případného vzniklého modrého zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS.*

Uchovává se chráněn před světlem.

Jodid rtuťnatodraselný RS

Viz *Tetrajodortuťnatan draselný RS.*

Jodid rtuťnatodraselný zásaditý RS

Viz *Tetrajodortuťnatan draselný zásaditý RS.*

Jodid rtuťnatý R

HgI_2 M_r 454,4 CAS 7774-29-0

Červený těžký krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, acetonu a etheru, dobře rozpustný v přebytku *jodidu draselného RS.*

Uchovává se chráněn před světlem.

Jodid sodný R

Viz článek *Natrii iodidum.*

Jodistan draselný R

KIO_4 M_r 230,0 CAS 7790-21-8

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky, dobře rozpustné ve vodě.

Jodistan draselný s chloridem železitým RS

1 g *jodistanu draselného R* se rozpustí v 5 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (120 g/l). Po přidání 20 ml *vody R* a 1,5 ml *chloridu železitého RS1* se zředí stejným roztokem hydroxidu draselného na 50 ml.

Jodistan sodný R

$NaIO_4$ M_r 213,9 CAS 7790-28-5

Obsahuje nejméně 99,0 % $NaIO_4$.

Bílý krystalický prášek nebo bílé krystalky. Je dobře rozpustný ve vodě a v minerálních kyselinách.

Jodistan sodný RS

1,07 g *jodistanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Jodobismutitan draselný RS

K 0,85 g *dusičnan-oxidu bismutitého R* se přidá 40 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny octové ledové R* a 20 ml roztoku *jodidu draselného R* (400 g/l).

Jodobismutitan draselný RS1

100 g *kyseliny vinné R* se rozpustí ve 400 ml *vody R*, přidá se 8,5 g *dusičnan-oxidu bismutitého R* a 1 h se mechanicky třepe. Přidá se 200 ml roztoku *jodidu draselného R* (400 g/l) a protřepe se. Nechá se stát 24 h a přefiltruje se.

Uchovává se chráněn před světlem.

Jodobismutitan draselný RS2

Základní roztok. 1,7 g *dusičnan-oxidu bismutitého R* a 20 g *kyseliny vinné R* se suspenduje ve 40 ml *vody R*. K suspenzi se přidá 40 ml roztoku *jodidu draselného R* (400 g/l), 1 h se třepe a zfiltruje se. Roztok se může uchovávat několik dní chráněn před světlem.
Detekční roztok. V čas potřeby se smíchá 5 ml základního roztoku s 15 ml *vody R*.

Jodobismutitan draselný zředěný RS

100 g *kyseliny vinné R* se rozpustí v 500 ml *vody R* a přidá se 50 ml *jodobismutitanu draselného RS1*.

Uchovává se chráněn před světlem.

Jodobismutitan draselný zředěný RS1

K 0,85 g *dusičnan-oxidu bismutitého R* se přidá 40 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny octové ledové R* a 50 ml roztoku *jodidu draselného R* (500 g/l) a třepe se do rozpuštění. V čas potřeby se k 1 ml tohoto roztoku přidají 2 ml *kyseliny octové ledové R* a 10 ml *vody R*.

5-Jodouracil R

$C_4H_3IN_2O_2$ M_r 238,0 CAS 696-07-1

5-Jod-1*H*,3*H*-pyrimidin-2,4-dion
TT: asi 276 °C, za rozkladu.

Chromatografie. Zkouší se postupem uvedeným v článku *Idoxuridinum*, nanáší se 5 μl roztoku (0,25 g/l). Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Kadmium R

Cd A_r 112,4 CAS 10108-64-2

Stříbrobílý lesklý kov, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v kyselině dusičné a horké kyselině chlorovodíkové.

Kaolin lehký R

CAS 1332-58-7

Čištěný přírodní hydratovaný křemičitan hlinitý. Obsahuje vhodnou disperzní látku.

Světlý bílý prášek bez částic písku, mazlavý na dotek, prakticky nerozpustný ve vodě a v minerálních kyselinách.

Hrubé částice. 5,0 g se umístí do skleněného válce se zabroušenou zátkou asi 160 mm dlouhého a asi 35 mm v průměru a přidá se 60 ml roztoku *difosforečnanu sodného R* (10 g/l). Důkladně se protřepe a nechá se 5 min stát. Pipetou se odstraní 50 ml tekutiny z bodu asi 5 cm pod povrchem. Ke zbývající tekutině se přidá 50 ml *vody R*, třepe se, nechá se ustát a odstraní se 50 ml tekutiny stejným způsobem. Postup se opakuje, dokud není odstraněno celkem 400 ml. Zbývající suspenze se přenese do odpařovací misky, odpaří se do sucha na vodní lázni a zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 25 mg (0,5 %).

Jemné částice. 5,0 g se rozptýlí ve 250 ml *vody R* silným třepáním po dobu 2 min. Směs se ihned vyleje do skleněného válce o průměru 50 mm a pomocí pipety se 20 ml přenese do skleněné misky, odpaří se do sucha na vodní lázni a suší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Zbytek suspenze se nechá stát 4 h při 20 °C a pipetou se 5 cm pod povrchem odebere dalších 20 ml bez rozčeření sedimentu, přenese se do skleněné misky, odpaří se do sucha a suší do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Hmotnost druhého zbytku není menší než 70 % hmotnosti prvního zbytku.

Karbazol R

$C_{12}H_9N$ M_r 167,2 CAS 86-74-8

Dibenzopyrrol

Krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v acetonu, těžce rozpustné v lihu 96%.

TV: asi 245 °C.

Karbofenothion R

$C_{11}H_{16}ClO_2PS_3$ M_r 342,9 CAS 786-19-6

O,O-Diethyl-S-{[(4-chlorfenyl)thio]methyl}dithiofosfat

Nažloutlá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s organickými rozpouštědly.

d_4^{25}: asi 1,27.

Karbomer R

CAS 9007-20-9

Příčně síťovaný polymer kyseliny akrylové. Obsahuje vysoký podíl (56 % až 68 %) karboxylových skupin, počítáno na látku sušenou 1 h při 80 °C. Střední relativní molekulová hmotnost je asi $3 \cdot 10^6$.

Hodnota pH (*2.2.3*). Asi 3; měří se suspenze 10 g/l.

Karvakrol R

$C_{10}H_{14}O$ M_r 150,2 CAS 499-75-2

5-Isopropyl-2-methylfenol

Hnědavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, velmi snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 0,975.
n_D^{20}: asi 1,523.
TV: asi 237 °C.

Karvon R

$C_{10}H_{14}O$ M_r 150,2 CAS 2244-16-8

(*S*)-*p*-Mentha-6,8-dien-2-on; (+)-2-methyl-5-(1-methylethylenyl)-2-cyklohexenon

Kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96 %.

d_{20}^{20}: asi 0,965.
n_D^{20}: asi 1,500.
$[\alpha]_D^{20}$: asi +61°.
TV: asi 230 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

β-Karyofylen R

$C_{15}H_{24}$ M_r 204,4 CAS 87-44-5

(*E*)-(1*R*,9*S*)-4,11,11-Trimethyl-8-methylenbicyklo[7,2,0]undek-4-en

Olejovitá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.

d_4^{17}: asi 0,905.
n_D^{20}: asi 1,492.
$[\alpha]_D^{15}$: asi -5,2°.
TV_{14}: 129 °C až 130 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*), jak je předepsáno v článku *Caryophylli etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,5 % z celkové plochy píků.

Kasein R

CAS 9000-71-9

Směs příbuzných fosfoproteinů z mléka.

Bílý amorfní prášek nebo bílá zrnka. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v nepolárních organických rozpouštědlech. Rozpouští se v kyselině chlorovodíkové na roztok slabě fialového zbarvení. Tvoří soli s kyselinami a zásadami. Izoelektrický bod leží asi při pH 4,7. Alkalické roztoky jsou levotočivé.

Katechin R

$C_{15}H_{14}O_6 . nH_2O$ M_r 290,3 (bezvodého) CAS 154-23-4

(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-chromantriol

Synonyma. D-Katechin; (+)-katechin hydrát; (+)-3-cianidanol

Bezbarvé jehličkovité krystaly, dobře rozpustné v horké vodě, v acetonu, v kyselině octové a v ethanolu, mírně rozpustné ve vodě a v etheru, prakticky nerozpustné v etheru petrolejovém a v toluenu. Při uchovávání ztrácí vodu.
TT: asi 214 °C, za rozkladu.

Chromatografie (2.2.27). Zkouší se postupem uvedeným v článku *Tormentillae radix*. Nanáší se 20 μl zkoušeného roztoku (1 mg/ml) v *methanolu R*. Na získaném chromatogramu je po postřiku jen jedna hlavní skvrna o R_F asi 0,7.

Katex R

Měnič iontů v protonové formě. Obsahuje sulfonové skupiny vázané na příčně síťovaném polymeru, jehož základ tvoří polystyren s 8 % divinylbenzenu. Dodává se ve formě kuliček, jejichž průměr je uveden za názvem zkoumadla u příslušných zkoušek.

Katex silně kyselý R

Měnič iontů v protonové formě. Obsahuje sulfonové skupiny vázané na příčně síťovaném polymeru, jehož základ tvoří polystyren s 8 % divinylbenzenu. Dodává se ve formě kuliček o průměru 0,3 mm až 1,2 mm, pokud není uvedeno jinak.

Kapacita. 4,5 mmol/g až 5 mmol/g při obsahu vody 50 % až 60 %.

Příprava sloupce. Pokud není uvedeno jinak, použije se skleněná trubice o délce 400 mm a o vnitřním průměru 20 mm se zatavenou skleněnou fritou. Plní se do výšky 200 mm měničem iontů smíchaným s *vodou R*. Při plnění se odstraňují vzduchové bubliny. Hladina kapaliny nesmí klesnout pod hladinu měniče iontů.

Jestliže se měnič iontů nachází v protonové formě, promývá se tak dlouho *vodou R*, až se na neutralizaci 50 ml eluátu za použití 0,1 ml *oranže methylové RS* spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Jestliže se měnič iontů nachází ve formě Na^+ nebo je požadována regenerace, promývá se pomalu 100 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS* a *vody R* a potom *vodou R*, jak je uvedeno výše.

Katex slabě kyselý R

Měnič iontů v protonové formě. Obsahuje polymetakrylat s karboxylovými skupinami. Dodává se ve formě kuliček o průměru 75 μm až 160 μm.

Rozmezí pH pro použití. 5 až 14.

Nejvyšší pracovní teplota. 120 °C.

Klobetasolpropionat R

$C_{25}H_{32}ClFO_5$ M_r 467,0 CAS 25122-46-7

9-Fluor-11ß,17-dihydroxy-21-chlor-16β-methylpregna-1,4-dien-3,20-dion-17-propionat

Bílý krystalický prášek, nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v acetonu.
$[\alpha]_D^{20}$: asi +104° (v dioxanu).
TT: asi 196 °C.

Kodeiniumfosfat R

Viz článek *Codeini phosphas hemihydricus.*

Kodein R

Viz článek *Codeinum*.

Kofein R

Viz článek *Coffeinum*.

Kortisonacetat R

Viz článek *Cortisoni acetas*.

Kresol R

C_7H_8O M_r 108,1 CAS 95-48-7

o-Kresol; 2-methylfenol

Krystalky nebo přechlazená kapalina tmavnoucí na světle a na vzduchu. Je mísitelný s ethanolem a s etherem, dobře se rozpouští v asi 50 částech vody a v roztocích alkalických hydroxidů.

d_{20}^{20}: asi 1,05.

n_D^{20}: 1,540 až 1,550.

TV: asi 190 °C.

Teplota tuhnutí (*2.2.18*). Nejméně 30,5 °C.

Zbytek po odpaření. Nejvýše 0,1 %, stanoví se odpařováním na vodní lázni a sušením při 100 °C až 105 °C.

Uchovává se chráněn před světlem, vlhkostí a kyslíkem. Před použitím se destiluje.

Krevní destičky náhrada R

K 0,5 g až 1 g *fosfolipidu R* se přidá 20 ml *acetonu R* a nechá se 2 h stát za častého protřepávání. Odstřeďuje se 2 min a supernatantní tekutina se odstraní. Zbytek se vysuší ve vakuu, přidá se 20 ml *chloroformu R* a 2 h se protřepává. Zfiltruje se pomocí vakua a získaný zbytek se suspenduje v 5 ml až 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

Pro použití ve stanovení účinnosti faktoru IX se připraví ředění v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby rozdíl v době srážení mezi postupnými ředěními porovnávací látky byl asi 10 s.

Zředěné suspenze se uchovávají při teplotě -30 °C a použijí se v průběhu 6 týdnů.

Křemelina R

CAS 91053-39-3

Bílý nebo téměř bílý jemně granulovaný prášek, tvořený křemíkovými schránkami fosilních mořských rozsivek nebo jejich úlomků, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru. Látka může být identifikována mikroskopicky při 500násobném zvětšení.

Křemelina G R

Je to křemelina propraná kyselinou chlorovodíkovou a vyžíhaná; obsahuje 15 % síranu vápenatého hemihydrátu.

Jemný šedobílý prášek; šedá barva se stane zřetelnější při smočení vodou. Průměrná velikost částic je 10 μm až 40 μm.

Obsah síranu vápenatého. Stanoví se postupem uvedeným v odstavci *silikagel G R*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 7 až 8; měří se suspenze připravená třepáním 1,0 g s 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po dobu 5 min.

Dělicí schopnost. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*). Připraví se vrstva křemeliny G za použití roztoku *octanu sodného R* (2,7 g/l). Nanese se 5 μl roztoku laktosy, sacharosy, glukosy a fruktosy v *pyridinu R* obsahující 0,10 g/l jednotlivých složek. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *2-propanolu R* a *ethylacetatu R* (12 + 23 + 65) po dráze 14 cm. Vyvíjecí čas je asi 40 min. Po vysušení se vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu jsou přítomny 4 zřetelně oddělené nerozplývavé skvrny.

Křemelina pro chromatografii R

Bílý nebo nažloutlý lehký prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, ve zředěných kyselinách a v organických rozpouštědlech.

Rychlost filtrace. Použije se chromatografická kolona dlouhá 0,25 m o vnitřním průměru 10 mm s filtrem ze slinutého skla (100) a dvěma značkami v 0,10 m a 0,20 m nad filtrem. Do kolony se umístí dostatečné množství zkoušené látky tak, aby dosahovalo k první značce, a kolona se doplní *vodou R* k druhé značce. Když první kapky začnou vytékat z kolony, doplní se opět *vodou R* k druhé značce a měří se čas potřebný k vytečení prvních 5 ml z kolony. Rychlost průtoku není menší než 1 ml/min.

Vzhled eluátu. Eluát získaný při zkoušce na rychlost filtrace je bezbarvý (*2.2.2, Metoda I*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 1,00 g se přidá 10 ml *vody R*, silně se protřepe a nechá se 5 min stát. Suspenze se zfiltruje přes filtr předem promytý horkou *vodou R* do neutrální reakce. K 2,0 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS;* roztok je žlutý. K 2,0 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1;* roztok je nejvýše slabě růžový.

Látky rozpustné ve vodě. 10,0 g se převede do chromatografické kolony 0,25 m dlouhé o vnitřním průměru 10 mm a promývá se *vodou R*. Zachytí se prvních 20 ml eluátu, odpaří se k suchu a odparek se suší při 100 °C až 105 °C. Hmotnost odparku není větší než 10 mg.

Železo (*2.4.9*). K 0,50 g se přidá 10 ml směsi stejných dílů *kyseliny chlorovodíkové RS* a *vody R*, silně se protřepe, nechá se 5 min stát a filtruje se. 1,0 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na železo (200 μg/g).

Ztráta žíháním. Nejvýše 0,5 %. Během zahřívání do červeného žáru (600 °C) látka nezhnědne nebo nezčerná.

Křemelina pro plynovou chromatografii R

Bílý nebo téměř bílý jemně granulovaný prášek, tvořený křemíkovými schránkami fosilních mořských rozsivek nebo jejich úlomky, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru. Látka může být identifikována mikroskopicky při 500násobném zvětšení. Látka je čištěná působením *kyseliny chlorovodíkové R* a potom promýváním *vodou R*.

Velikost částic. Nejvýše 5 % křemeliny zůstane na sítu č. 180. Nejvýše 10 % křemeliny přejde přes síto č. 125.

Křemelina pro plynovou chromatografii R1

Bílý nebo téměř bílý prášek jemně granulovaný, tvořený křemíkovými schránkami fosilních mořských rozsivek nebo jejich úlomky, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

Látka může být identifikována mikroskopicky při 500násobném zvětšení. Látka je čištěná působením *kyseliny chlorovodíkové R* a potom promýváním *vodou R*.

Velikost částic. Nejvýše 5 % křemeliny zůstane na sítu č. 250. Nejvýše 10 % křemeliny přejde přes síto č. 180.

Křemelina pro plynovou chromatografii R2

Bílý až téměř bílý jemně granulovaný prášek, tvořený křemíkovými schránkami fosilních mořských rozsivek nebo jejich úlomky se specifickým povrchem 0,5 m ²/g, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru. Látka může být identifikována mikroskopicky při 500násobném zvětšení. Přečišťuje se působením *kyseliny chlorovodíkové R* a potom promýváním *vodou R*.

Velikost částic. Nejvýše 5 % křemeliny zůstane na sítu č. 180. Nejvýše 10 % křemeliny projde přes síto č. 125.

Křemelina silanizovaná pro plynovou chromatografii R

Křemelina pro plynovou chromatografii R se silanizuje dimethyldichlorsilanem nebo jiným vhodným silanizačním činidlem.

Křemelina silanizovaná pro plynovou chromatografii R1

Připraví se z rozdrcených růžových křemelinových žáruvzdorných cihel silanizací dimethyldichlorsilanem nebo jiným vhodným silanizačním činidlem. Látka je čištěná *kyselinou chlorovodíkovou R* a promytá *vodou R*.

Kurkumin R

$C_{21}H_{20}O_6$ M_r 368,4 CAS 458-37-7

1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion

Oranžově hnědý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v kyselině octové ledové a prakticky nerozpustný v etheru.

TT: asi 183 °C.

Kyanguanidin R

$C_2H_4N_4$ M_r 84,1 CAS 461-58-5

Dikyandiamid; 1-kyanguanidin

Bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu.

TT: asi 210 °C.

Kyanid draselný R

KCN M_r 65,1 CAS 151-50-8

Bílý krystalický prášek, bílá hmota nebo bílé granule. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Kyanid draselný RS

Roztok 100 g/l.

Kyanokobalamin R

Viz článek *Cyanocobalaminum*.

Kyselina N-acetylneuraminová R

$C_{11}H_{19}NO_9$ M_r 309,3 CAS 131-48-6

5-Acetamido-3,5-deoxy-α-D-glycero-D-galakto-2-nonulopyranosonová kyselina; kyselina O-sialová

Bílé jehličkovité krystaly, dobře rozpustné ve vodě a methanolu, těžce rozpustné v ethanolu, prakticky nerozpustné v acetonu a etheru.

$[\alpha]_D^{20}$: asi -36 °, měří se roztok (10 g/l).

TT: Asi 186 °C, za rozkladu.

Kyselina adipová R

$C_6H_{10}O_4$ M_r 146,1 CAS 124-04-9

Hranolky, snadno rozpustné v methanolu, dobře rozpustné v acetonu, prakticky nerozpustné v etheru petrolejovém.

TT: asi 152 °C.

Kyselina aleuritová R

$C_{16}H_{32}O_5$ M_r 304,4 CAS 533-87-9

Kyselina (9*RS*,10*SR*)-9,10,16-trihydroxyhexadekanová

Bílý prášek, mastný na omak, dobře rozpustný v methanolu.

TT: asi 101 °C.

Kyselina amidosírová R

H_3NO_3S M_r 97,1 CAS 5329-14-6

Bílý krystalický prášek nebo krystaly, je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu, v lihu 96%, v methanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

TT: asi 205 °C, za rozkladu.

Kyselina 4-aminobenzoová R

$C_7H_7NO_2$ M_r 137,1 CAS 99-O5-8

Bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru petrolejovém.

TT: asi 187 °C.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek popsaných v článku *Procaini hydrochloridum*. Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Uchovává se chráněna před světlem.

Kyselina 4-aminobenzoová RS

1 g *kyseliny 4-aminobenzoové R* se rozpustí ve směsi 18 ml *kyseliny octové bezvodé R*, 20 ml *vody R* a 1 ml *kyseliny fosforečné R*. Bezprostředně před použitím se smíchají 2 objemové díly roztoku se 3 objemovými díly *acetonu R*.

Kyselina 2-aminobenzoová R

Viz *Kyselina anthranilová R.*

Kyselina aminohippurová R

$C_9H_{10}N_2O_3$ M_r 194,2 CAS 61-78-9

Kyselina N-(4-aminobenzoyl)aminooctová

Bílý až téměř bílý prášek, mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

TT: asi 200 °C.

Kyselina aminomethylalizarindioctová R

$C_{19}H_{15}NO_8 \cdot 2H_2O$ M_r 421,4 CAS 3952-78-1

Kyselina N-(3,4-dihydroxy-2-antrachinonylmethyl)iminodioctová dihydrát

Jemný světle hnědožlutý až oranžově hnědý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v roztocích alkalických hydroxidů.

TT: asi 185 °C.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 1,000 g látky.

Kyselina aminomethylalizarindioctová RS

0,192 g *kyseliny aminomethylalizarindioctové R* se rozpustí v 6 ml čerstvě připraveného *hydroxidu sodného l mol/l RS.* Přidá se 750 ml *vody R*, 25 ml *tlumivého roztoku sukcinátového o pH 4,6* a po kapkách *kyselina chlorovodíková 0,5 mol/l RS* do změny zbarvení z fialově červeného na žluté (pH 4,5 až 5). Přidá se 100 ml *acetonu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

Kyselina antranilová R

$C_7H_7NO_2$ M_r 137,1 CAS 118-92-3

Kyselina 2-aminobenzoová

Bílý až slabě žlutý krystalický prášek, mírně rozpustný ve studené vodě, snadno rozpustný v horké vodě, v lihu 96%, v etheru a v glycerolu. Roztoky v lihu 96% nebo v etheru, zvláště v glycerolu, fialově fluoreskují.

TT: asi 145 °C.

Kyselina askorbová R

Viz článek *Acidum ascorbicum.*

Kyselina askorbová RS

50 mg se rozpustí v 0,5 ml *vody R* a zředí se *dimethylformamidem R* na 50,0 ml.

Kyselina barbiturová R

$C_4H_4N_2O_3$ M_r 128,1 CAS 67-52-7

1*H*,3*H*,5*H*-Pyrimidin-2,4,6-trion

Bílý až téměř bílý prášek, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě a ve zředěných kyselinách.

TT: asi 253 °C.

Kyselina benzoová R

Viz článek *Acidum benzoicum.*

Kyselina boritá R

Viz článek *Acidum boricum.*

Kyselina bromovodíková 30% R

30% roztok kyseliny bromovodíkové v *kyselině octové ledové R.* Před otevřením obsahu se opatrně odplyní.

Kyselina bromovodíková zředěná RS

5,0 ml *kyseliny bromovodíkové 30% R* se umístí do hnědožlutých lahviček opatřených polyethylenovými zátkami. Hermeticky se uzavřou pod *argonem R* a uchovávají se v temnu. Bezprostředně před použitím se přidá 5,0 ml *kyseliny octové ledové R* a protřepe se.

Kyselina butylboritá R

$C_4H_{11}BO_2$ M_r 101,9 CAS 4426-47-5

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_4H_{11}BO_2$.
TT: 90 °C až 92 °C.

Kyselina citronová bezvodá R

Viz článek *Acidum citricum.*

Kyselina citronová R

Viz článek *Acidum citricum monohydricum.*

Při použití pro limitní zkoušku na železo vyhovuje následujícímu dodatečnému požadavku: 0,50 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *kyseliny thioglykolové R*, promíchá se a zalkalizuje *amoniakem 17,5% RS*. Zředí se *vodou R* na 20 ml. Nevznikne žádné růžové zbarvení.

Kyselina cyklohexylendinitrilotetraoctová R

$C_{14}H_{22}N_2O_8 \cdot H_2O$ M_r 364,4 CAS 13291-61-7

CDTA; monohydrát kyseliny *trans*-cyklohexylen-1,2-dinitrilo-N,N,N′N′-tetraoctové
Bílý krystalický prášek.
TT: asi 204 °C.

Kyselina deoxyribonukleová sodná sůl R

CAS 73049-39-5

Asi 85 % látky má M_r 2 . 10^7 nebo vyšší.
Bílá vláknitá hmota získaná z telecích brzlíků.

Zkouška způsobilosti. 10 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku imidazolovém o pH 6,5* a zředí se jím na 10,0 ml (roztok a). 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným tlumivým roztokem na 50,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 260 nm je v rozmezí 0,4 až 0,8.

K 0,5 ml roztoku (a) se přidá 0,5 ml *tlumivého roztoku imidazolového o pH 6,5* a 3 ml roztoku *kyseliny chloristé R* (25 g/l $HClO_4$); vznikne sraženina. Po odstřeďování se měří absorbance supernatantní tekutiny při 260 nm proti směsi 1 ml stejného tlumivého roztoku a 3 ml stejného roztoku kyseliny chloristé. Absorbance není vyšší než 0,3.

Do dvou zkumavek se převede po 0,5 ml roztoku (a) a 0,5 ml porovnávacího roztoku streptodornasy s obsahem 10 m.j. v 1 ml *tlumivého roztoku imidazolového o pH 6,5*. Do jedné zkumavky se rychle přidají 3 ml roztoku *kyseliny chloristé R* (25 g/l $HClO_4$); vznikne sraženina. Směs se odstřeďuje a získá se supernatantní tekutina (a). Druhá zkumavka se zahřívá 15 min při 37 °C. Po přidání 3 ml stejného roztoku kyseliny chloristé se směs odstřeďuje. Získá se supernatantní tekutina (b), u níž se měří absorbance při 260 nm proti roztoku (a). Zjištěná absorbance není menší než 0,15.

Kyselina diazobenzensulfonová RS1

0,90 g *kyseliny sulfanilové R* se rozpustí ve směsi 30 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 70 ml *vody R*. Ke 3 ml tohoto roztoku se přidají 3 ml roztoku *dusitanu sodného R* (50 g/l). 5 min se chladí v ledové lázni, přidá se 12 ml roztoku dusitanu sodného a opět se ochladí. Zředí se *vodou R* na 100 ml a nechá se v ledové lázni.

Připravuje se v čas potřeby, ale před použitím se roztok 15 min nechá stát.

Kyselina dichloroctová R

$C_2H_2Cl_2O_2$ M_r 128,9 CAS 79-43-6

Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 1,566.
n_D^{20}: asi 1,466.
TV: asi 193 °C.

Kyselina dichloroctová RS

67,0 ml *kyseliny dichloroctové R* se zředí *vodou R* na 300,0 ml a neutralizuje se *amoniakem 17,5% RS* za použití *papíru lakmusového modrého R*. Ochladí se, přidá se 33,0 ml *kyseliny dichloroctové R* a zředí se *vodou R* na 600,0 ml.

Kyselina dinitrobenzoová R

$C_7H_4N_2O_6$ M_r 212,1 CAS 99-34-3

Kyselina 3,5-dinitrobenzoová

Téměř bezbarvé krystalky, těžce rozpustné ve vodě, velmi snadno rozpustné v lihu 96 %.
TT: asi 206 °C.

Kyselina dinitrobenzoová RS

Roztok 20 g/l v *lihu 96% R*.

Kyselina 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoová) R

$C_{14}H_8N_2O_8S_2$ M_r 396,4 CAS 69-78-3

Bis(3-karboxy-4-nitrofenyl)disulfid; Ellmanovo činidlo; DTNB

Žlutý prášek, mírně rozpustný v lihu 96%.
TT: asi 242 °C.

Kyselina dusičná dýmavá R

CAS 52583-42-3

Čirá nebo nažloutlá kapalina, na vzduchu dýmavá.
d_{20}^{20}: asi 1,5.

Kyselina dusičná R

HNO_3 M_r 63,0 CAS 7697-37-2

Obsahuje 63,0 % až 70,0 % HNO_3.
Čirá, prakticky bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou.
d_{20}^{20}: 1,384 až 1,416.
Roztok 10 g/l je silně kyselý a vyhovuje zkoušce na dusičnany (*2.3.1.*).

Vzhled. Čirá kapalina (*2.2.1*), není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Chloridy (*2.4.4*). K 5 g se přidá 10 ml *vody R* a 0,3 ml *dusičnanu stříbrného RS2*. Roztok se nechá 2 min stát chráněn před světlem. Opalescence tohoto roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného za stejných podmínek smícháním 13 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R*, 0,5 ml základního *roztoku chloridů* (5 μg Cl/ml) a 0,3 ml *dusičnanu stříbrného RS2* (0,5 μg/g).

Sírany (*2.4.13*). K 10 g se přidá 0,20 g *uhličitanu sodného R*. Odpaří se do sucha a zbytek se rozpustí v 15 ml *vody destilované R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (2 μg/g). Připraví se porovnávací roztok smícháním 2 ml základního *roztoku síranů* (*10 μg SO_4/ml*) a 13 ml *vody destilované R*.

Arsen (*2.4.2*). 50 g se opatrně zahřívá s 0,5 ml *kyseliny sírové R* do vzniku bílých par. Ke zbytku se přidá 1 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (100 g/l) a zředí se *vodou R* na 2 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na arsen (0,02 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,0 ml základního *roztoku arsenu (1 μg As/ml)*.

Železo (*2.4.9*). Zbytek ze zkoušky Síranový popel se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (1 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 10 ml roztoku připraveného ve zkoušce na železo se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Síranový popel. Nejvýše 0,001 %. 100 g se opatrně odpaří do sucha. Zbytek se navlhčí několika kapkami *kyseliny sírové R* a žíhá se do tmavočerveného žáru.

Stanovení obsahu. K 1,50 g se přidá 50,0 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,10 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 63,0 mg HNO_3.

Uchovává se chráněna před světlem.

Kyselina dusičná zředěná RS

Obsahuje asi 125 g/l HNO_3 (M_r 63,0).
20 g *kyseliny dusičné R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina dusičná prostá olova a kadmia R

Kyselina dusičná R, která vyhovuje následujícím zkouškám:

Zkoušený roztok. Ke 100 g se přidá 0,1 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí slabým zahřátím ve *vodě R* a po ochlazení se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Kadmium. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*). Měří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou a plamene vzduch-acetylen nebo vzduch--propan. Obsahuje nejvýše 0,1 μg/g kadmia (Cd).

Olovo. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*). Měří se absorbance při 283,3 nm nebo 217,0 nm za použití olověné lampy s dutou katodou a plamene vzduch-acetylen. Obsahuje nejvýše 0,1 μg/g olova (Pb).

Kyselina dusičná prostá olova R

Kyselina dusičná R, která vyhovuje následující zkoušce:

Ke 100 g se přidá 0,1 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí slabým zahřátím ve *vodě R* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Stanoví se obsah olova atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*). Měří se absorbance při 283,3 nm nebo 217,0 nm za použití olověné lampy s dutou katodou a plamene vzduch-acetylen. Obsahuje nejvýše 0,1 μg/g olova (Pb).

Kyselina 2-ethylhexanová R

$C_8H_{16}O_2$ M_r 144,2 CAS 149-57-5

Bezbarvá kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,91.

n_D^{20}: asi 1,425.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*). Vstřikuje se 1 μl roztoku připraveného následovně: 0,2 g se suspenduje v 5 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 5 ml *hexanu R* a 1 min se třepe. Vrstvy se nechají oddělit a použije se horní vrstva. Použije se chromatografický postup uvedený ve zkoušce Kyselina 2-ethylhexanová v článku *Amoxicillinum natricum*. Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, není větší než 2,5 % plochy hlavního píku.

Kyselina 2-ethyl-2-methyljantarová R

$C_7H_{12}O_4$ M_r 160,2 CAS 631-31-2

Kyselina 2-ethyl-2-methylbutandiová

TT: 104 °C až 107 °C.

Kyselina fenoxyoctová R

$C_8H_8O_3$ M_r 152,1 CAS 122-59-8

Kyselina 2-fenoxyethanová

Téměř bílé krystaly, mírně rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%, v etheru a v kyselině octové ledové.

TT: asi 98 °C.

Chromatografie. Zkouší se postupem uvedeným v článku *Phenoxymethylpenicillinum*. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Kyselina fluorovodíková R

HF M_r 20,01 CAS 7664-39-3

Obsahuje nejméně 40,0 % HF. Čirá bezbarvá kapalina.

Zbytek po žíhání. Nejvýše 0,05 %. Kyselina fluorovodíková se odpaří v platinovém kelímku a zbytek se opatrně žíhá do konstantní hmotnosti.

Stanovení obsahu. Kuželová baňka se zabroušenou zátkou obsahující 50,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* se zváží. Přidají se 2 g kyseliny fluorovodíkové a opět se zváží. Titruje se *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 20,01 mg HF.

Uchovává se v polyethylenových obalech.

Kyselina fosfomolybdenová R

$12\ MoO_3 . H_3PO_4 . nH_2O$ CAS 51429-74-4

Oranžovožluté jemné krystaly, snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96% a v etheru.

Kyselina fosfomolybdenová RS

4,0 g *kyseliny fosfomolybdenové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 40 ml, potom se opatrně přidá za chlazení 60 ml *kyseliny sírové R.*

Připravuje se v čas potřeby.

Kyselina fosforečná R

Viz článek *Acidum phosphoricum 85%.*

Kyselina fosforečná zředěná RS

Viz článek *Acidum phosphoricum 10%.*

Kyselina fosfowolframová RS

10 g *wolframanu sodného R* se vaří 3 h pod zpětným chladičem s 8 ml *kyseliny fosforečné R* a 75 ml *vody R.* Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina ftalová R

$C_8H_6O_4$ M_r 166,1 CAS 88-99-3

Kyselina 1,2-benzendikarboxylová

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný v horké vodě a lihu 96%.

Kyselina gallová R

$C_7H_6O_5 . H_2O$ M_r 188,1 CAS 5995-86-8

Monohydrát kyseliny 3,4,5-trihydroxybenzoové

Dlouhé lesklé jehlice nebo krystalický prášek, bezbarvý nebo slabě žlutý, dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v horké vodě, v lihu 96% a v glycerolu, těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve své krystalové vodě při 120 °C a taje asi při 260 °C, za rozkladu.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek uvedených v článku *Uvae ursi folium;* chromatogram vykazuje jen jednu hlavní skvrnu.

Kyselina glutamová R

Viz článek *Acidum glutamicum.*

Kyselina glycyrrhetinová R

$C_{30}H_{46}O_4$ M_r 470,7 CAS 471-53-4

Enoxolon

Směs α- a β-glycyrrhetinových kyselin, kde převládá β-izomer; kyselina 12,13-didehydro-3β--hydroxy-11-oxo-30-oleanová

Bílý nebo nažloutle hnědý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu a kyselině octové ledové.

$[\alpha]_D^{20}$: +145° až +155°, měří se roztok (10,0 g/l) v *ethanolu R.*

Chromatografie (*2.2.27*). Na vrstvu *silikagelu GF$_{254}$ R* připravenou za použití roztoku *kyseliny fosforečné R* 0,25% (*V/V*) se nanese 5 μl roztoku zkoušené látky (5 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R.* Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Chromatogram se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu je patrná tmavá skvrna o R_F asi 0,3 odpovídající kyselině β-glycyrrhetinové a menší skvrna o R_F asi 0,5 odpovídající kyselině α-glycyrrhetinové. Po postříkání *anisaldehydem RS* a zahřívání 10 min při 100 °C až 105 °C se zbarví obě skvrny modrofialově. Mezi nimi může být přítomna menší modrofialová skvrna.

Kyselina glykolová R

$C_2H_4O_3$ M_r 76,0 CAS 79-14-1

Kyselina 2-hydroxyoctová

Krystalky, dobře rozpustné ve vodě, v acetonu, v lihu 96%, v etheru a v methanolu.

TT: asi 80 °C.

Kyselina hexachloroplatičitá R

$H_2PtCl_6 . 6H_2O$ M_r 517,9 CAS 18497-13-7

Hexahydrát kyseliny chloroplatičité

Obsahuje nejméně 37,0 % platiny (A_r 195,1).

Hnědočervené krystalky nebo krystalická hmota. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%.

Stanovení obsahu. Spálí se 0,200 g, vyžíhá se při 900 °C do konstantní hmotnosti a zůstatek (platina) se zváží.

Uchovává se chráněna před světlem.

Kyselina 12-hydroxystearová R

$C_{18}H_{36}O_3$ M_r 300,5 CAS 106-14-9

Kyselina 12-hydroxyoktadekanová

TT: 71 °C až 74 °C.

Kyselina chloristá R

$HClO_4$ M_r 100,5 CAS 7601-90-3

Obsahuje 70,0 až 73,0 % $HClO_4$.

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou.

d_{20}^{20}: asi 1,7.

Stanovení obsahu. K 2,50 g se přidá 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 100,5 mg $HClO_4$.

Kyselina chloristá RS

8,5 ml *kyseliny chloristé R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina chloroctová R

$C_2H_3ClO_2$ M_r 94,5 CAS 79-11-8

Kyselina monochloroctová

Bezbarvé nebo bílé rozplývavé krystaly, velmi dobře rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96% a v etheru.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina chlorogenová R

$C_{16}H_{18}O_9$ M_r 354,3 CAS 327-97-9

Kyselina (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyklohexankarboxylová

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, v acetonu a v ethanolu.

$[\alpha]_D^{25}$: -36° (C = 1, H_2O).

TT: 208 °C až 209 °C.

Chromatografie (2.2.27). Zkouší se postupem uvedeným v článku *Crataegi folium cum flore*. Nanáší se 10 μl roztoku (0,1 mg/ml) v *methanolu R*. Na chromatogramu je po postřiku v ultrafialovém světle při 365 nm jedna modrá skvrna.

Kyselina chlorovodíková R

Viz článek *Acidum hydrochloricum 35%*.

Kyselina chlorovodíková RS

Obsahuje 250 g/l HCl. 70 g *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina chlorovodíková 10% RS

Obsahuje 10,9 % HCl (asi 3 mol/l).

Příprava: 44 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina chlorovodíková zředěná RS

Obsahuje 73 g/l HCl. 20 g *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina chlorovodíková zředěná RS1

Obsahuje 0,37 g/l HCl. 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* se zředí *vodou R* na 200,0 ml.

Kyselina chlorovodíková zředěná RS2

30 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* se zředí *vodou R* na 1000 ml a upraví se pH na 1,6 ± 0,1.

Kyselina chlorovodíková 2 mol/l RS

206,0 g *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Kyselina chlorovodíková 3 mol/l RS

309,0 g *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Kyselina chlorovodíková 6 mol/l RS

618,0 g *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Kyselina chlorovodíková v lihu RS

5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* se zředí *lihem 96% R* na 500,0 ml.

Kyselina chlorovodíková v lihu 0,1 mol/l RS

9,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *lihem 96% prostým aldehydů R* na 1000,0 ml.

Kyselina 5-chlorsalicylová R

$C_7H_5ClO_3$ M_r 172,6 CAS 321-14-2

Kyselina 5-chlor-2-hydroxybenzoová

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, dobře rozpustný v methanolu.

TT: asi 173 °C.

Kyselina chromotropová sodná sůl R

$C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$ M_r 400,3 CAS 5808-22-0

Schultz 1136

Dihydrát disodné soli kyseliny 4,5-dihydroxy-2,7-naftalendisulfonové

Nažloutlý bílý prášek, dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Kyselina chromsírová

Nasycený roztok *oxidu chromového R* v *kyselině sírové R*

Kyselina isobarbiturová R

$C_4H_4N_2O_3$ M_r 128,1 CAS 496-76-4

5-Hydroxyuracil; pyrimidin-2,4,5-triol

Bílý krystalický prášek.

TT: asi 310 °C, za rozkladu.

Chromatografie. Zkouší se postupem uvedeným v článku *Fluorouracilum*. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna o R_F asi 0,3.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina jantarová R

$C_4H_6O_4$ M_r 118,1 CAS 110-15-6

Kyselina butandiová

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, dobře rozpustné ve vodě a v lihu 96%.

TT: 184 °C až 187 °C.

Kyselina 2-jodbenzoová R

$C_7H_5IO_2$ M_r 248,0 CAS 88-67-5

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 160 °C.

Chromatografie (*2.2.27*). Na vrstvu *celulosy pro chromatografii F_{254} R* se nanese 20 μl roztoku připraveného rozpuštěním 40 mg zkoušené látky ve 4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředěného *vodou R* na 10 ml. Vyvíjí se horní vrstvou získanou třepáním směsi objemových dílů *toluenu R*, *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (40 + 40 + 20) po dráze 12 cm.

Po vysušení na vzduchu se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Kyselina 2-jodhippurová R

$C_9H_8INO_3 . 2H_2O$ M_r 341,1 CAS 147-58-0

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě.

TT: asi 170 °C.

Voda (*2.5.12*). 9 % až 13 %, stanoví se s 1,000 g.

Chromatografie (*2.2.27*). Na tenkou vrstvu *celulosy pro chromatografii F_{254}R* se nanese 20 μl roztoku připraveného rozpuštěním 40 mg zkoušené látky ve 4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředěného *vodou R* na 10 ml. Vyvíjí se horní vrstvou získanou třepáním směsi objemových dílů *toluenu R*, *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (40 + 40 + 20) po dráze 12 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Kyselina jodovodíková R

HI M_r 127,9 CAS 10034-85-2

Připravuje se destilací kyseliny jodovodíkové nad červeným fosforem v proudu *oxidu uhličitého R* nebo *dusíku R*. Použije se bezbarvá nebo většinou bezbarvá konstantně vroucí směs (55 % až 58 % HI) destilující mezi 126 °C až 127 °C.

Uchovává se v malých, hnědožlutých lahvích předem vypláchnutých *oxidem uhličitým R* nebo *dusíkem R* se skleněnými zabroušenými zátkami zalitými parafinem. Lahve se uchovávají na tmavém místě.

Kyselina kalkonkarboxylová R

$C_{21}H_{14}N_2O_7S \cdot 3H_2O$ M_r 492,5 CAS 3737-95-9

Trihydrát kyseliny 2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naftylazo)naftalen-3-karboxylové

Hnědočerný prášek, těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v acetonu a v lihu 96%, mírně rozpustný ve zředěném roztoku hydroxidu sodného.

Kyselina kalkonkarboxylová s chloridem sodným R

1 díl *kyseliny kalkonkarboxylové R* se smíchá s 99 díly *chloridu sodného R.*

Zkouška citlivosti. 50 mg směsi se rozpustí ve směsi 2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 100 ml *vody R;* roztok je zbarven modře. Po přidání 1 ml roztoku *síranu hořečnatého R* (10,0 g/l) a 0,1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (1,5 g/l) je roztok fialový a po přidání 0,15 ml roztoku *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* se roztok zbarví čistě modře.

Kyselina kávová R

$C_9H_8O_4$ M_r 180,2 CAS 331-39-5

Kyselina 3,4-dihydroxyskořicová

Bílé nebo téměř bílé krystaly nebo plátky, snadno rozpustné v horké vodě a v lihu 96%, mírně rozpustné ve studené vodě.

TT: asi 225 °C, za rozkladu.

Čerstvě připravený roztok při pH 7,6 vykazuje absorpční maximum (*2.2.25*) při 293 nm a 329 nm.

Kyselina křemičitowolframová R

$H_4O_{40}SiW_{12} \cdot nH_2O$ CAS 11130-20-4

Bílé až slabě nažloutlé rozplývavé krystalky, velmi dobře rozpustné ve vodě a v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina kyanoctová R

$C_3H_3NO_2$ M_r 85,1 CAS 372-09-8

Bílé až nažloutlé hygroskopické krystaly, velmi snadno rozpustné ve vodě.

Uchovává se ve vzduchotěsném obalu.

Kyselina laktobionová R

$C_{12}H_{22}O_{12}$ M_r 358,3 CAS 96-82-2

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

TT: asi 115 °C.

Kyselina listová R

Viz článek *Acidum folicum.*

Kyselina maleinová R

Viz článek *Acidum maleicum.*

Kyselina máselná R

$C_4H_8O_2$ M_r 88,1 CAS 107-92-6

Kyselina butanová

Olejovitá kapalina, mísitelná s vodou, lihem 96% a etherem.

Kyselina metafosforečná R

$(HPO_3)_n$ CAS 37267-86-0

Sklovité chuchvalce nebo tyčinky obsahující část metafosforečnanu sodného, hygroskopické, velmi snadno rozpustné ve vodě.

Dusičnany. 1,0 g se vaří s 10 ml *vody R*, ochladí se, přidá se 1 ml *indigokarmínu RS*, 10 ml *kyseliny sírové prosté dusičnanů R* a zahřívá se k varu. Slabé modré zbarvení zůstává.

Redukující látky. Nejvýše 0,01 % redukujících látek, počítaných jako H_3PO_3. 35,0 g se rozpustí v 50 ml *vody R*. Přidá se 5 ml roztoku *kyseliny sírové R* (200 g/l), 50 mg *bromidu draselného R* a 5,0 ml *bromičnanu draselného 0,02 mol/l VS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Nechá se ochladit a přidá se 0,50 g *jodidu draselného R*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,02 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška.

1 ml *bromičnanu draselného 0,02 mol/l VS* odpovídá 4,10 mg H_3PO_3.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina methakrylová R

$C_4H_6O_2$ M_r 86,1 CAS 79-41-4

Kyselina 2-methyl-2-propenová; kyselina metakrylová

Bezbarvá kapalina.

n_D^{20}: asi 1,431.

TV: asi 160 °C.

TT: asi 16 °C.

Kyselina methansulfonová R

CH_4O_3S M_r 96,1 CAS 75-75-2

Čirá bezbarvá kapalina mísitelná s vodou, těžce rozpustná v toluenu, prakticky nerozpustná v hexanu. Látka tuhne při teplotě nižší než 20 °C.

d_{20}^{20}: asi 1,48.

n_D^{20}: asi 1,430.

Kyselina methoxyfenyloctová R

$C_9H_{10}O_3$ M_r 166,2 CAS 7021-09-2

Kyselina (*RS*)-2-methoxy-2-fenyloctová

Bílý krystalický prášek nebo bílé nebo téměř bílé krystalky, mírně rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 70 °C.

Uchovává se v chladu.

Kyselina mléčná R

Viz článek *Acidum lacticum*.

Kyselina mravenčí bezvodá R

CH_2O_2 M_r 46,03 CAS 64-18-6

Obsahuje nejméně 98,0 % CH_2O_2.

Bezbarvá kapalina, žíravina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 1,22.

Stanovení obsahu. Do zvážené kuželové baňky obsahující 10 ml *vody R* se rychle přidá asi 1 ml zkoušené látky a opět se zváží. Přidá se 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 46,03 mg CH_2O_2.

Kyselina octová ledová R

$C_2H_4O_2$ M_r 60,1 CAS 64-19-7

Kyselina octová koncentrovaná

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_2H_4O_2$.

Roztok 100 g/l je silně kyselý. Roztok 5 g/l neutralizovaný *amoniakem zředěným RS2* vyhovuje zkoušce (b) na octany (*2.3.1*).

d_{20}^{20}: 1,052 až 1,053.

TV: 117 °C až 119 °C.

Stanovení obsahu. 5,00 g se v odměrné baňce zředí *vodou R* na 100,0 ml. 25,0 ml se titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 60,1 mg $C_2H_4O_2$.

Kyselina octová bezvodá R

$C_2H_4O_2$ M_r 60,1 CAS 64-19-7

Obsahuje nejméně 99,6 % $C_2H_4O_2$.

Bezbarvá kapalina nebo bílé, lesklé, kapraďovité krystaly. Je mísitelná (nebo velmi snadno rozpustná) s vodou, s lihem 96%, s etherem, glycerolem 85% a s většinou silic a mastných olejů.

Roztok 100 g/l je silně kyselý (*2.2.4*) a roztok 5 g/l neutralizovaný *amoniakem zředěným RS2* vyhovuje zkoušce (b) na octany (2.3.1).

d_{20}^{20}: 1,052 až 1,053.

TV: 117 °C až 119 °C.

Teplota tuhnutí (*2.2.18*). Nejméně 15,8 °C.

Voda (*2.5.12*). Nejvýše 0,4 %. Jestliže je obsah vody větší než 0,4 %, upraví se přidáním vypočítaného množství *acetanhydridu R*.

Uchovává se chráněna před světlem.

Kyselina octová RS

Obsahuje 290 g/l až 310 g/l $C_2H_4O_2$ (M_r 60,1).

30 g *kyseliny octové ledové R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina octová zředěná RS

Obsahuje 115 g/l až 125 g/l $C_2H_4O_2$ (M_r 60,1).

12 g *kyseliny octové ledové R* se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kyselina palmitová R

$C_{16}H_{32}O_2$ M_r 256,4 CAS 57-10-3

Kyselina hexadekanová

Bílé krystalické šupiny, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v horkém lihu 96% a v etheru.

TT: asi 63 °C.

Chromatografie (*2.2.27*). Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Chloramphenicoli palmitas*. Na chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Kyselina pikrová R

Viz *Trinitrofenol R*.

Kyselina propionová R

$C_3H_6O_2$ M_r 74,1 CAS 79-09-4

Olejovitá kapalina, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru, mísitelná s vodou.

d_{20}^{20}: asi 0,990.

n_D^{20}: asi 1,387.

TV: asi 141.

TT: asi -21 °C.

Kyselina ricinolejová R

$C_{18}H_{34}0_3$ M_r 298,5 CAS 141-22-0

Kyselina 12-hydroxyolejová

Žlutá nebo žlutohnědá viskózní kapalina, obsahující směs mastných kyselin získaných hydrolýzou ricinového oleje, prakticky nerozpustná ve vodě, velmi snadno rozpustná v ethanolu, dobře rozpustná v etheru

d_{20}^{20}: asi 0,942.

n_D^{20}: asi 1,472.

TT: asi 285 °C, za rozkladu.

Kyselina salicylová R

Viz článek *Acidum salicylicum*.

Kyselina seleničitá R

H_2SeO_3 M_r 129,0 CAS 7783-00-8

Rozplývavé krystaly, snadno rozpustné ve vodě.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina sírová R

H_2SO_4 M_r 98,1 CAS 7664-93-9

Obsahuje 95,0 % až 97,0 % H_2SO_4.

Bezbarvá olejovitá žíravá kapalina, silně hygroskopická, mísí se s vodou a s lihem 96% za silného uvolňování tepla.

d_{20}^{20}: 1,834 až 1,837.

Roztok 10 g/l reaguje silně kysele a vyhovuje zkoušce na sírany (*2.3.1*).

Vzhled. Je čirá (*2.2.1*) a bezbarvá (*2.2.2, Metoda II*).

Oxidovatelné látky. 20 g se za chlazení opatrně vleje do 40 ml *vody R* a přidá se 0,5 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*. Do 5 min fialové zbarvení nezmizí.

Chloridy. 10 g se za silného chlazení vleje do 10 ml *vody R*. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 20 ml. Přidá se 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a 2 min se uchovává chráněn před světlem. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený za použití 1 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*, 19 ml *vody R* a 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS2* (0,5 μg/g).

Dusičnany. 50 g nebo 27,2 ml se za chlazení vleje do 15 ml *vody R*. Přidá se 0,2 ml čerstvě připraveného roztoku *brucinu R* (50 g/l) v *kyselině octové ledové R*. Vzniklé červené zbarvení není po 5 min silnější než zbarvení porovnávacího roztoku, který byl současně připraven z 12,5 ml *vody R*, 50 g *kyseliny sírové prosté dusičnanů R*, 2,5 ml základního *roztoku dusičnanů (10 μg NO_3*/ml) a 0,2 ml roztoku *brucinu R* (50 g/l) v *kyselině octové ledové R* (0,5 μg/g).

Amonium. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Po ochlazení se po kapkách přidá 10 ml *hydroxidu sodného R* (200 g/l) a 1 ml *tetrajodortuťnanu draselného zásaditého RS*. Roztok není zbarven silněji než směs 5 ml základního *roztoku amoniaku (1 μg NH_4/ml*), 15 ml *vody R*, 10 ml *hydroxidu sodného R* (200 g/l) a 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* (2 μg/g).

Arsen (*2.4.2*). K 50 g se přidají 3 ml *kyseliny dusičné R,* opatrně se odpaří asi na 10 ml. Po ochlazení se přidá 20 ml *vody R* a zahustí se na 5 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (0,02 μg As/ml). Na přípravu porovnávacího roztoku se použije 1,0 ml základního *roztoku arsenu (1 μg As/ml)*.

Železo (*2.4.9*). Popel ze zkoušky Zbytek po spálení se za mírného zahřátí rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (1 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 10 ml roztoku z limitní zkoušky na železo se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Zbytek po spálení. Nejvýše 0,001 %. 100 g se opatrně odpaří v kelímku a zbytek se zahřeje do červeného žáru.

Stanovení obsahu. Baňka se zabroušenou zátkou obsahující 30 ml *vody R* se přesně zváží. Přidá se 0,8 ml zkoušené látky a po ochlazení se znovu přesně zváží. Po přidání 0,1 ml *červeně methylové RS* se titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 49,04 mg H_2SO_4.

Látka se uchovává ve skleněných obalech se zabroušenou zátkou nebo v jiných nádobách z materiálů odolných vůči kyselině sírové.

Kyselina sírová zředěná RS

Obsahuje 98 g/l H_2SO_4.

K 60 ml *vody R* se přidá 5,5 ml *kyseliny sírové R*. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100 ml.

Stanovení obsahu. K 30 ml *vody R* v baňce se zabroušenou zátkou se přidá 10,0 ml zkoušené látky. Po přidání 0,1 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru se titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 49,04 mg H_2SO_4.

Kyselina sírová prostá dusíku R

Vyhovuje požadavkům odstavce *Kyselina sírová R* a následující zkoušce:

Dusičnany. K 5 ml *vody R* se opatrně přidá 45 ml zkoušené látky. Po ochlazení na 40 °C se přidá 8,0 mg *difenylbenzidinu R.* Roztok se zbarví jen slabě růžově nebo velmi slabě světle modře.

Kyselina sírová v lihu RS

K 60 ml *lihu 96% R* se opatrně za stálého chlazení a míchání přidá 20 ml *kyseliny sírové R.* Po ochlazení se zředí *lihem 96% R* na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Kyselina sírová v lihu 2,5 mol/l RS

K 60 ml *ethanolu R* se opatrně za stálého chlazení přidá 14 ml *kyseliny sírové R.* Po ochlazení se zředí *ethanolem R* na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Kyselina sírová v lihu 0,25 mol/l RS

10 ml *kyseliny sírové v lihu 2,5 mol/l RS* se zředí *ethanolem R* na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Kyselina stearová R

$C_{18}H_{36}O_2$ M_r 284,5 CAS 57-11-4

Kyselina oktadekanová

Bílý prášek nebo šupinky, na omak mastné, prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v horkém lihu 96% a v etheru.

TT: asi 70 °C.

Kyselina sulfanilová R

$C_6H_7NO_3S$ M_r 173,2 CAS 121-57-3

Kyselina 4-aminobenzensulfonová

Bezbarvé krystaly, mírně rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Kyselina sulfosalicylová R

$C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$ M_r 254,2 CAS 5965-83-3

Kyselina 2-hydroxy-5-sulfobenzoová

Bílý krystalický prášek nebo bílé krystaly; je velmi snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustná v etheru.

TT: asi 109 °C.

Kyselina šťavelová R

$C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ M_r 126,1 CAS 6153-56-6

Bílé krystalky, dobře rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%.

Kyselina šťavelová v kyselině sírové RS

Roztok *kyseliny šťavelové R* (50 g/l) v ochlazené směsi stejných objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R.*

Kyselina 2-thienyloctová R

$C_6H_6O_2S$ M_r 142,1 CAS 1918-77-0

Kyselina 2-(2-thienyl)octová

Hnědý prášek.

TT: asi 65 °C.

Kyselina thioglykolová R

$C_2H_4O_2S$ M_r 92,1 CAS 68-11-1

Kyselina 2-merkaptooctová

Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, dobře rozpustná v lihu 96%.

Kyselina 4-toluensulfonová R

$C_7H_8O_3S.H_2O$ M_r 190,2 CAS 6192-52-5

Monohydrát kyseliny 4-methylbenzensulfonové

Obsahuje nejméně 87,0 % $C_7H_8O_3S$. Bílý krystalický prášek nebo bílé krystaly. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru.

Kyselina trifluoroctová R

$C_2HF_3O_2$ M_r 114,0 CAS 76-05-1

Obsahuje nejméně 99 % $C_2HF_3O_2$.

Kapalina, mísitelná s acetonem, s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,53.

TV: asi 72 °C.

Použije se jakost vhodná pro dělení proteinů.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina trichloroctová R

$C_2HCl_3O_2$ M_r 163,4 CAS 76-03-9

Bezbarvé krystaly nebo rozplývavá krystalická hmota, velmi snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Kyselina trichloroctová RS

40,0 g *kyseliny trichloroctové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Koncentrace se ověří titrací *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* a upraví se podle potřeby na (40 ± 1) g/l.

Kyselina valerová R

$C_5H_{10}O_2$ M_r 102,1 CAS 109-52-4

Bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 0,94.

n_D^{20}: asi 1,409.

TV: asi 186 °C.

Kyselina vinná R

Viz článek *Acidum tartaricum.*

Kyslík R

O_2 M_r 32,00 CAS 7782-44-7

Obsahuje nejméně 99,99 % (*V/V*) O_2.

Dusík a argon. Méně než 100 ml/m^3.

Oxid uhličitý. Méně než 10 ml/m^3.

Oxid uhelnatý. Méně než 5 ml/m^3.

Lakmus R

CAS 1393-92-6

Schultz 1386

Indigově modrá barviva získaná z různých druhů lišejníků, např. *Rocella, Lecanora* aj. Jsou dobře rozpustná ve vodě a prakticky nerozpustná v lihu 96%.

Barevný přechod. Při pH 5 až 8 z červeného zbarvení do modrého.

Laktosa R

Viz článek *Lactosum.*

Laurylsíran sodný R

Viz článek *Natrii laurilsulfas.*

Leucin R

Viz článek *Leucinum.*

Líh 96% R

C_2H_6O M_r 46,07 CAS 64-17-5

Obsahuje 95,1 % až 96,9 % (*V/V*) C_2H_6O.

Čirá bezbarvá hořlavá těkavá kapalina, mísitelná s vodou, s acetonem, s etherem a s glycerolem.

d_{20}^{20}: 0,805 až 0,812.

TV: 78 °C až 79 °C.

Líh 96% prostý aldehydů R

1200 ml *lihu 96% R* se smíchá s 5 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (400 g/l), 10 ml ochlazeného roztoku *hydroxidu draselného R* (500 g/l), protřepe se a nechá se stát několik dnů a zfiltruje se. Bezprostředně před použitím se filtrát destiluje.

Líh R x% (V/V)

Smíchají se vhodné objemové díly *vody R* a *lihu 96% R*, vezme se v úvahu zahřátí a objemová kontrakce provázející přípravu takové směsi k získání roztoku, jehož konečný obsah ethanolu odpovídá hodnotě x.

Limonen R

$C_{10}H_{16}$ M_r 136,2 CAS 5989-27-5

D-Limonen; (+)-*p*-mentha-1,8-dien; (R)-4-isopropenyl-1-methyl-1-cyklohexen

Bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,84.

n_D^{20}: 1,471 až 1,474.

$[\alpha]_D^{20}$: +96° až +106°.

TV: 175 °C až 177 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 99,0 % z celkové plochy píků.

Linalol R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,2 CAS 78-70-6

(*RS*)-3,7-Dimethyl-1,6-oktadien-3-ol

Směs dvou stereoizomerů (likareol a koriandrol).

Kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v etheru.

d_{20}^{20}: asi 0,860.

n_D^{20}: asi 1,462.

TV: asi 200 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Anisi etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku. Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Linalylacetat R

$C_{12}H_{20}O_2$ M_r 196,3 CAS 115-95-7

3,7-Dimethyl-1,6-oktadien-3-yl-acetat; bergamol

Bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a etherem. Silně páchne po bergamotové silici a levanduli.

d_{25}^{25}: 0,895 až 0,912.

n_D^{20}: asi 1,446.

TV: asi 215 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) postupem uvedeným v článku *Aurantii amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku odpovídající linalylacetatu je nejméně 95,0 % celkové plochy píků.

Lithium R

Li A_r 6,94 CAS 7439-93-2

Měkký kov, na povrchu čerstvého řezu je stříbrošedý. Na vzduchu rychle ztrácí lesk. Reaguje bouřlivě s vodou za uvolnění vodíku a tvorby roztoku hydroxidu lithného. Dobře se rozpouští v methanolu za tvorby vodíku a roztoku methanolatu lithného. Lithium je prakticky nerozpustné v etheru a v etheru petrolejovém.

Uchovává se pod etherem petrolejovým nebo tekutým parafinem.

Makrogol 200 R

CAS 25322-68-3

Polyethylenglykol 200

Čirá bezbarvá nebo téměř bezbarvá viskózní kapalina, velmi snadno rozpustná v acetonu a v ethanolu, prakticky nerozpustná v etheru a v mastných olejích.

d_{20}^{20}: asi 1,127.

n_D^{20}: asi 1,450.

Makrogol 200 R1

500 ml *makrogolu R* se přemístí do 1000ml baňky s kulatým dnem. Za použití rotačního odpařovacího přístroje se odstraní případné těkavé složky během 6 h při teplotě 60 °C a vakuu s tlakem 1,5 kPa až 2,5 kPa.

Makrogol 300 R

Viz článek *Macrogolum 300.*

Makrogol 400 R

Viz článek *Macrogolum 400.*

Makrogol 1000 R

Viz článek *Macrogolum 1000.*

Makrogol 1500 R

Viz článek *Macrogolum 1500.*

Makrogol 6000 R

Viz článek *Macrogolum 6000.*

Makrogol 20 000 R

Viz článek *Macrogolum 20 000.*

Makrogol 20 000 2-nitrotereftalat R

Polyethylenglykol 20 000 2-nitrotereftalat

Tvrdá bílá nebo většinou bílá voskovitá pevná látka, dobře rozpustná v acetonu.

Makrogoladipat R

$(C_8H_{12}O_4)_n$ M_r $(172,2)_n$

Bílá voskovitá hmota, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v chloroformu.
TT: asi 43 °C.

Makrogolsukcinat R

$(C_6H_8O_4)_n$ M_r $(144,1)_n$

Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v chloroformu.
TT: asi 102 °C.

Manganistan draselný R

Viz článek *Kalii permanganas*.

Manganistan draselný RS

Roztok 30 g/l.

Manganistan draselný v kyselině fosforečné R

3,0 g *manganistanu draselného R* se rozpustí ve směsi 15 ml *kyseliny fosforečné R* a 70 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Mannitol R

Viz článek *Mannitolum*.

Mannosa R

$C_6H_{12}O_6$ M_r 180,2 CAS 3458-28-4

D-(+)-Mannosa

Bílý krystalický prášek nebo malé bílé krystalky. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v ethanolu.
$[\alpha]_D^{20}$: +13,7° až +14,7°, stanoví se v roztoku 200 g/l ve *vodě R* obsahující asi 0,05 % NH_3.
TT: asi 132 °C, za rozkladu.

Mastek R

Viz článek *Talcum*.

Měď R

Cu A_r 63,55 CAS 7440-50-8

Čištěná fólie, hobliny, drát nebo prášek ryzího kovu elektrolytické čistoty.

Mekloziniumdichlorid R

Viz článek *Meclozini dihydrochloridum*.

Melamin R

$C_3H_6N_6$ M_r 126,1 CAS 108-78-1

1,3,5-Triazin-2,4,6-triamin; *sym*-triaminotriazin

Bílý amorfní prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Menadion R

Viz článek *Menadionum*.

Menthofuran R

$C_{10}H_{14}O$ M_r 150,2 CAS 17957-94-7

3,9-Epoxy-*p*-mentha-3,8-dien; 3,6-dimethyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzofuran

Slabě namodralá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,965.

n_D^{20}: asi 1,480.

$[\alpha]_D^{20}$: asi +93°.

TV: 196 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 97,0 % z celkové plochy píků.

Menthol R

Viz článek *Levomentholum* a *Mentholum racemicum.*

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Menthon R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,2 CAS 14073-97-3

(-)-*trans*-*p*-Menthan-3-on; (2*S*,5*R*)-2-isopropyl-5-methylcyklohexanon

Obsahuje proměnlivé množství isomenthonu.

Bezbarvá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, velmi snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 0,897.

n_D^{20}: asi 1,450.

Při použití pro plynovou chromatrografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 90,0 % z celkové plochy píků.

Menthylacet R

$C_{12}H_{22}O_2$ M_r 198,3 CAS 16409-45-3

(*RS*)-2-Isopropyl-5-methylcyklohexylacetat

Bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,92.

n_D^{20}: asi 1,447.

TV: asi 225 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

2-Merkaptoethanol R

C_2H_6OS M_r 78,1 CAS 60-24-2

Kapalina mísitelná s vodou.

d_{20}^{20}: asi 1,116.

TV: asi 157 °C.

Merkaptopurin R

Viz článek *Mercaptopurinum*.

Methanol R

CH_4O M_r 32,04 CAS 67-56-1

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: 0,791 až 0,793.

TV: 64 °C až 65 °C.

Methanol R1

Vyhovuje požadavkům odstavce *Methanol R*.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následujícímu dodatečnému požadavku:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 20 % při 210 nm, nejméně 50 % při 220 nm, nejméně 75 % při 230 nm, nejméně 95 % při 250 nm, nejméně 98 % při 260 nm a výše; měří se proti *vodě R* jako porovnávací tekutině.

Methanol bezvodý R

CAS 67-56-1

K 1000 ml *methanolu R* se přidá 5,0 g *hořčíku R*. Je-li třeba, reakce se vyvolá přidáním 0,1 ml *chloridu rtuťnatého RS*. Když přestane vyvíjení plynu, kapalina se destiluje a destilát se shromažďuje v suché baňce chráněné před vlhkostí.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,3 g/l.

Methanol prostý aldehydů R

Obsahuje nejvýše 0,001 % aldehydů a ketonů.

Příprava. 25 g *jodu R* se rozpustí v 1 litru *methanolu R* a roztok se za stálého míchání vleje do 400 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS.* Přidá se 150 ml *vody R* a roztok se nechá stát 16 h. Zfiltruje se a vaří pod zpětným chladičem do vymizení pachu jodoformu. Roztok se destiluje frakční destilací.

Methansulfonat sodný R

CH_3SO_3Na M_r 118,1 CAS 2386- 57-4

Bílý krystalický hygroskopický prášek.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Methenamin R

$C_6H_{12}N_4$ M_r 140,2 CAS 100-97-0

Hexamin; hexamethylentetramin

Bezbarvý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě.

L-Methionin R

Viz článek *Methioninum.*

Methoxyethanol R

$C_3H_8O_2$ M_r 76,1 CAS 109-86-4

2-Methoxyethanol; ethylenglykolmonomethylether

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s lihem 96%, s etherem a s acetonem.

d_{20}^{20}: asi 0,97.

n_D^{20}: asi 1,403.

TV: asi 125 °C.

Methylacetat R

$C_3H_6O_2$ M_r 74,1 CAS 79-20-9

Čirá bezbarvá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,933.

n_D^{20}: asi 1,361.

TV: asi 56 °C až 58 °C.

Methylantranilat R

$C_8H_9NO_2$ M_r 151,2 CAS 134-20-3

Methylester kyseliny 2-aminobenzoové

Bezbarvé krystaly nebo nažloutlá kapalina. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: 24 °C až 25 °C.

TV: 134 °C až 136 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) postupem uvedeným v článku *Auranti amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 95 % celkové plochy píků.

Methylarachidat R

$C_{21}H_{42}O_2$ M_r 326,6 CAS 1120-28-1

Methylikosanoat

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{21}H_{42}O_2$; stanoví se plynovou chromatografií (*2.4.22*). Bílá nebo nažloutlá krystalická hmota, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru petrolejovém.

TT: asi 46 °C.

Methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochlorid R

$C_8H_{10}ClN_3S \cdot H_2O$ M_r 233,7 CAS 149022-15-1

Monohydrát 3-methyl-2(3*H*)-benzothiazolinon-hydrazonhydrochloridu

Téměř bílý nebo nažloutlý krystalický prášek.

TT: asi 270 °C.

Test způsobilosti pro stanovení aldehydů. Ke 2 ml *methanolu prostého aldehydu R* se přidá 60 μl roztoku *propionaldehydu R* (1,0 g/l) v *methanolu prostém aldehydu R* a 5 ml roztoku methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu (4,0 g/l). Po promíchání se nechá 30 min stát. Současně se připraví slepá zkouška bez roztoku propionaldehydu. Přidá se 25,0 ml roztoku *chloridu železitého R* (2,0 g/l) ke zkoušenému roztoku i ke slepé zkoušce, zředí se *acetonem R* na 100,0 ml a promíchá se. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 660 nm za použití roztoku získaného při slepé zkoušce jako porovnávací kapaliny není menší než 0,62.

2-Methyl-2-buten R

Viz *Amylen R*.

2-Methylbutan R

C_5H_{12} M_r 72,2 CAS 78-78-4

Isopentan

Obsahuje nejméně 99,5 % C_5H_{12}.

Velmi hořlavá bezbarvá kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,621.

n_D^{20}: asi 1,354.

TV: asi 29 °C.

Voda (2.5.12). Nejvýše 0,02 %.

Zbytek po odpaření. Nejvýše 0,0003 %.

Transmitance (2.2.25). Nejméně 50 % při 210 nm, nejméně 85 % při 220 nm, nejméně 98 % při 240 nm a výše; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Methylcelulosa 450 R

Viz článek *Methylcellulosum*.

Jmenovitá viskozita je 450 mPa.s.

Methylcinnamat R

$C_{10}H_{10}O_2$ M_r 162,2 CAS 103-26-4

Bezbarvé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96% a v etheru.
n_D^{20}: asi 1,56.
TV: asi 260 °C.
TT: 34 °C až 36 °C.

Methyldekanoat R

$C_{11}H_{22}O_2$ M_r 186,3 CAS 110-42-9

Methylester kyseliny n-dekanové

Obsahuje nejméně 99,0 % $C_{11}H_{22}O_2$.

Čirá bezbarvá nebo žlutlá kapalina, dobře rozpustná v etheru petrolejovém.
d_{20}^{20}: 0,871 až 0,876.
n_D^{20}: 1,425 až 1,426.

Cizí látky. Zkouší se plynovou chromatografií (*2.2.28*). Nastřikují se stejné objemy následujících roztoků:
1. roztok zkoušené látky (0,02 g/l) v *sirouhlíku R*,
2. roztok zkoušené látky (2 g/l) v *sirouhlíku R*,
3. *sirouhlík R*.

Chromatografický postup se provede za podmínek uvedených v článku *Adeps lanae* ve zkoušce Butylhydroxytoluen. Součet ploch píků, kromě píku rozpouštědla a hlavního píku na chromatogramu roztoku 2, je menší než hlavní pík na chromatogramu roztoku 1.

4-O-Methyldopaminiumchlorid R

$C_9H_{14}ClNO_2$ M_r 203,7 CAS 645-33-0

2-(3-Hydroxy-4-methoxyfenyl)ethylamoniumchlorid
TT: 207 °C až 208 °C.

Chromatografie (*2.2.27*). Chromatografický postup se provede za podmínek uvedených v článku *Dopamini hydrochloridum*. Nanáší se 10 μl roztoku (0,075/l) v *methanolu R*. Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

3-O-Methyldopaminiumchlorid R

$C_9H_{14}ClNO_2$ M_r 203,7 CAS 1477-68-5

2-(4-Hydroxy-3-methoxyfenyl)ethylamoniumchlorid
TT: 213 °C až 215 °C.

Chromatografie (*2.2.27*). Chromatografický postup se provede za podmínek uvedených v článku *Dopamini hydrochloridum*. Nanáší se 10 μl roztoku (0,075/l) v *methanolu R*. Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Methylenbisakrylamid R

$C_7H_{10}N_2O_2$ M_r 154,2 CAS 110-26-9

N,N′-Methylenbispropenamid

Jemný bílý nebo téměř bílý prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96 %. Taje za rozkladu nad 300 °C.

Methylenchlorid R

Viz *Dichlormethan R.*

Methylfenyloxazolylbenzen R

$C_{26}H_{20}N_2O_2$ M_r 392,5 CAS 3073-87-8

1,4-Bis(5-fenyl-4-methyl-2-oxazolyl)benzen

Jemný zelenožlutý prášek s modrou fluorescencí nebo malé krystalky. Je dobře rozpustný v lihu 96 %, mírně rozpustný v xylenu.

TT: asi 233 °C.

Při použití pro kapalinovou scintilaci má odpovídající analytickou jakost.

Methyllaurat R

$C_{13}H_{26}O_2$ M_r 214,4 CAS 111-82-0

Methyldodekanoat

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{13}H_{26}O_2$; stanoví se plynovou chromatografií (*2.4.22*). Bezbarvá nebo žlutá kapalina, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru petrolejovém.

d_{20}^{20}: asi 0,87.

n_D^{20}: asi 1,431.

TT: asi 5 °C.

Methylmetakrylat R

$C_5H_8O_2$ M_r 100,1 CAS 80-62-6

Methylester kyseliny 2-methyl-2-propenové; methylmetakrylat

Bezbarvá kapalina.

n_D^{20}: asi 1,414.

TT: asi -48 °C.

TV: asi 100 °C.

Obsahuje vhodnou stabilizační přísadu.

Methylmyristat R

$C_{15}H_{30}O_2$ M_r 242,4 CAS 124-10-7

Methyltetradekanoat

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{15}H_{30}O_2$; stanoví se plynovou chromatografií (*2.4.22.*). Bezbarvá nebo slabě žlutá kapalina, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru petrolejovém.

d_{20}^{20}: asi 0,87.

n_D^{20}: asi 1,437.

TT: asi 20 °C.

2-Methyl-5-nitroimidazol R

$C_4H_5N_3O_2$ M_r 127,1 CAS 88054-22-2

Bílý až světle žlutý prášek.

TT: 252 °C až 254 °C.

Methyloleat R

$C_{19}H_{36}O_2$ M_r 296,4 CAS 112-62-9

(*Z*)-Methyl-9-oktadekanoat

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{19}H_{36}O_2$; stanoví se plynovou chromatografií (*2.4.22*). Bezbarvá nebo slabě žlutá kapalina, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru petrolejovém.

d_{20}^{20}: asi 0,88.

n_D^{20}: asi 1,452.

Methylpalmitat R

$C_{17}H_{34}O_2$ M_r 270,5 CAS 112-39-0

Methylhexadekanoat

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{17}H_{34}O_2$; stanoví se plynovou chromatografií (*2.4.22*). Bílá nebo žlutá krystalická hmota, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru petrolejovém.

TT: asi 30 °C.

Methylparaben R

Viz článek *Methyparabenum*.

Methylpiperazin R

$C_5H_{12}N_2$ M_r 100,2 CAS 74879-18-8

1-Methylpiperazin

Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,90.

n_D^{20}: asi 1,466.

TV: asi 138 °C.

Methylstearat R

$C_{19}H_{38}O_2$ M_r 298,5 CAS 112-61-8

Methyloktadekanoat

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{19}H_{38}O_2$; stanoví se plynovou chromatografií (*2.4.22*). Bílá nebo žlutá krystalická hmota, dobře rozpustná v lihu 96% a v etheru petrolejovém.

TT: asi 38 °C.

Metol R

$C_{14}H_{20}N_2O_6S$ M_r 344,4 CAS 55-55-0

Bis(4-hydroxyfenylmethylamonium)sulfat

Bezbarvé krystaly, velmi snadno rozpustné ve vodě, těžce rozpustné v lihu 96%, prakticky nerozpustné v etheru.

TT: asi 260 °C.

Mléčnan vápenatý R

Viz článek *Calcii lactas pentahydricus*.

Močovina R

Viz článek *Urea.*

Modř bromfenolová R

$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ M_r 670 CAS 115-39-9

4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-yliden-)bis(2,6-dibromfenol)-*S,S*-dioxid; 3′,3″,5′,5″-tetrabromfenolsulfonftalein

Světle oranžově žlutý prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v roztocích alkalických hydroxidů.

Modř bromfenolová RS

0,10 g *modři bromfenolové R* se rozpustí v 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,05 ml *modři bromfenolové RS* se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení na modrofialové se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Barevný přechod. Při pH 2,8 až 4,4 ze žluté do modrofialové.

Modř bromfenolová RS1

50 mg *modři bromfenolové R* se slabým zahřátím rozpustí v 3,73 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Modř bromfenolová RS2

0,20 g *modři bromfenolové R* se rozpustí zahřátím ve směsi 3 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 10 ml *lihu 96% R.* Po ochlazení se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Modř bromthymolová R

$C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ M_r 624,4 CAS 76-59-5

4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-yliden)bis(2-brom-6-isopropyl-3-methylfenol)-S,S-dioxid; 3′,3″-dibromthymolsulfonftalein

Červenavě růžový až hnědý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Modř bromthymolová RS1

50 mg *modři bromthymolové R* se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,3 ml *modři bromthymolové RS1* se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *roztoku hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS.*

Barevný přechod. Při pH 5,8 až 7,4 ze žluté do modré.

Modř bromthymolová RS2

Roztok 10 g/l v *dimethylformamidu R*.

Modř bromthymolová RS3

0,10 g *modři bromthymolové R* se rozpustí zahřátím ve směsi 3,2 ml *hydroxidu sodného 0,05 mol/l RS* a 5 ml roztoku *lihu R* 90% (*V/V*) a zředí se roztokem *lihu R* 90% (*V/V*) na 250 ml.

Modř dextranová 2000 R

Připravuje se z dextranu o průměrné relativní molekulové hmotnosti $2 . 10^6$ zavedením polycyklického chromoforu, který zbarví látku modře. Stupeň substituce je 0,017. Lyofilizuje se a rozpouští se rychle a úplně ve *vodě R* a vodných roztocích solí.

Roztok (1 g/l) v *tlumivém fosforečnanovém roztoku o pH 7* vykazuje absorpční maximum (*2.2.25*) při 280 nm.

Modř fibrinová RS

1,5 g fibrinu se smíchá s 30 ml roztoku *indigokarmínu R* (5 g/l) v roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 1% (*V/V*). Směs se zahřeje na 80 °C a udržuje se při této teplotě za míchání po dobu asi 30 min. Nechá se vychladnout a zfiltruje se. Důkladně se promyje opakovaným suspendováním v roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 1% (*V/V*) a mícháním po dobu asi 30 min; zfiltruje se. Promývání se opakuje třikrát. Suší se při 50 °C. Rozmělní se.

Modř hydroxynaftolová sodná sůl R

$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{11}S_3$ M_r 620 CAS 63451-35-4

Trisodná sůl kyseliny 2,2′-dihydroxy-1,1′-azonaftalen-3′,4,6′-trisulfonové

Modř indofenolová R

$C_{18}H_{16}N_2O$ M_r 276,3 CAS 132-31-0

Colour Index 49700, Schultz 939

N-(4-Dimethylaminofenyl)-1,4-naftochinonmonoimin

Fialovočervený prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v chloroformu.

Chromatografie (*2.2.27*). Na vrstvu *silikagelu G R* se nanese 10 μl roztoku zkoušené látky (0,10 g/l) v *dichlormethanu R* a chromatogram se vyvíjí stejným rozpouštědlem po dráze 10 cm. Na získaném chromatogramu je jen hlavní skvrna a na startu zůstává další viditelná skvrna.

Modř kyselá 83 R

$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$ M_r 826,0 CAS 6104-59-2

Colour Index 42660

Modř brilantní; Coomassie brilantní modř R 250

Hnědý prášek, nerozpustný ve studené vodě, těžce rozpustný ve vroucí vodě a v ethanolu, dobře rozpustný v kyselině sírové, kyselině octové ledové a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Modř kyselá 90 R

$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ M_r 854 CAS 6104-58-1

Colour Index 42655

Sodná sůl vnitřní soli kyseliny 4-{[4-(4-ethoxyanilino)fenyl][4-(N-ethyl-3-sulfobenzylamino)-*o*--tolyl]methyl}-N-ethyl-3-methylfenylaminomethyl-3-benzensulfonové

Tmavě hnědý prášek s fialovým leskem, jednotlivé částice mají kovový lesk. Rozpouští se dobře ve vodě a ethanolu.

$A_{1cm}^{1\%}$: větší než 500, měří se při 577 nm roztok (0,01 g/l) v tlumivém roztoku o pH 7,0 a přepočítá se na vysušenou látku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Modř kyselá 92 R

$C_{26}H_{16}N_3Na_3O_{10}S$ M_r 695,6 CAS 3861-73-2

Colour Index 13390.

Modř Coomassie; sodná sůl anazolenu; trisodná sůl kyseliny 8-hydroxy-4′-fenylaminoazonaftalen-3,5′,6-trisulfonové

Tmavě modré krystaly, těžce rozpustné v lihu 96%, dobře rozpustné ve vodě, v acetonu, a v ethoxyethanolu.

Modř kyselá 92 RS

0,5 g *modři kyselé 92 R* se rozpustí ve směsi l0,0 ml *kyseliny octové ledové R*, 45 ml *lihu 96% R* a 45,0 ml *vody R*.

Modř methylenová R

$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot nH_2O$ M_r bezvodé 319,9 CAS 7220-79-3

Colour Index 52015, Schultz 1038

Methylthioniniumchlorid, tj. n-hydrát 3,7-bis(dimethylamino)fenazathioniniumchloridu

Látka je dodávána v různé hydratované formě a může obsahovat až 22 % vody.

Tmavě zelený až bronzově zbarvený krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Modř nilská A R

$C_{20}H_{21}N_3O_5S$ M_r 415,5 CAS 3625-57-8

Colour Index 51180, Schultz 1029

5-Amino-9-diethylaminobenzo[*a*]fenoxazinyliumhydrogensulfat

Zelený bronzově lesklý krystalický prášek, mírně rozpustný v kyselině octové, lihu 96% a pyridinu. Roztok 0,005 g/l v roztoku *lihu R* 50% (*V/V*) vykazuje absorpční maximum *(2.2.25*) při 640 nm.

Modř nilská A RS

Roztok 10 g/l v *kyselině octové bezvodé R.*

Zkouška citlivosti. 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* se smíchá s 0,25 ml roztoku modři nilské A; roztok je modrý. Přidáním nejvýše 0,1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* se zbarvení změní na modrozelené.

Barevný přechod. Při pH 9,0 až 13,0 z modré do červené.

Modř nitrotetrazoliová R

$C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$ M_r 818 CAS 298-83-9

3,3′-(3,3′-Dimethoxybifenyl-4,4′-diyl)bis[2-(4-nitrofenyl)-5-fenyl-2*H*-tetrazolium]dichlorid, modř *p*-nitrotetrazoliová

Krystaly, dobře rozpustné v methanolu na čirý žlutý roztok.

TT: asi 189 °C, za rozkladu.

Modř oracetová 2R R

$C_{20}H_{14}N_2O_2$ M_r 314,3 CAS 4395-65-7

Colour Index 61110

1-Amino-4-(fenylamino)anthrachinon

TT: asi 174 °C.

Modř pravá B R

$C_{14}H_{12}Cl_2N_4O_2$ M_r 339,2 CAS 84633-94-3

Colour Index 37235, Schultz 490

3,3′-dimethoxydifenyl-4,4′-bis(diazonium)-dichlorid

Tmavě zelený prášek, dobře rozpustný ve vodě. Je stabilizován přidáním chloridu zinečnatého.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Modř sulfanová R

$C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$ M_r 566,6 CAS 129-17-9

Colour Index 42045, Schultz 769

Sodná sůl 4-[bis(4-diethylaminofenyl)methyl]-3-sulfobenzensulfonové kyseliny

Fialový až purpurový prášek, dobře rozpustný ve vodě. Zředěné roztoky jsou zbarveny modře a po přidání *kyseliny chlorovodíkové R* se zbarvení změní na žluté.

Modř tetrazoliová R

$C_{40}H_{32}Cl_2N_8O_2$ M_r 728 CAS 1871-22-3

3,3′-(3,3′-Dimethoxy[1,1′-bifenyl]-4,4′-diyl)bis(2,5-difenyl-2*H*-tetrazolium)dichlorid

Žluté krystaly, těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a methanolu, prakticky nerozpustné v acetonu a etheru.

TT: asi 245 °C, za rozkladu.

Modř thymolová R

$C_{27}H_{30}O_5S$ M_r 466,6 CAS 76-61-9

Thymolsulfonftalein

4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-yliden)bis(2-isopropyl-5-methylfenol)-*S,S*-dioxid

Hnědozelený až zelenomodrý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Modř thymolová RS

0,10 g *modři thymolové R* se rozpustí ve směsi 2,15 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 0,1 ml roztoku modři thymolové se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS;* roztok je modrý. Přidáním nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* se zbarvení roztoku změní na žluté.

Barevný přechod. Při pH 1,2 až 2,8 z červené do žluté; při pH 8,0 až 9,6 z olivově zelené do modré.

Modř toluidinová R

$C_{15}H_{16}ClN_3S$ M_r 305,8 CAS 92-31-9

Colour Index 52040, Schultz 1041

3-Amino-7-dimethylamino-2-methyl-5-fenothiazinyliumchlorid

Tmavě zelený prášek, dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Molekulární síto R

Kuličky křemičitanu sodno-hlinitého o průměru 2 mm a velikosti pórů 0,4 nm.

Molybdenan hexaamonný R

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ M_r 1236 CAS 12054-85-2

Tetrahydrát heptamolybdenanu hexaamonného

Bezbarvé až slabě žluté nebo nazelenalé krystalky, dobře rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Molybdenan hexaamonný RS

Roztok 100 g/l.

Molybdenan hexaamonný RS2

5,0 g *molybdenanu hexaamonného R* se zahřátím rozpustí ve 30 ml *vody R*. Roztok se ochladí a pH se upraví *amoniakem zředěným RS2* na hodnotu 7,0 a zředí se *vodou R* na 50 ml.

Molybdenan hexaamonný RS3

Roztok I. 5,0 g *molybdenanu hexaamonného R* se rozpustí zahřátím ve 20 ml *vody R*.
Roztok II. 150 ml *lihu 96% R* se smíchá se 150 ml *vody R*. Za chlazení se přidá 100 ml *kyseliny sírové R*.

V čas potřeby se smíchá 80 objemových dílů roztoku II s 20 objemovými díly roztoku I.

Molybdenan hexaamonný RS4

1,0 g *molybdenanu hexaamonného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se *vodou R* na 40 ml. Přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 5 ml *kyseliny chloristé R* a zředí se *acetonem R* na 100 ml. Uchovává se chráněn před světlem, použitelný je 1 měsíc.

Molybdenan-kyselina sírová RS2

Asi 50 mg *molybdenanu hexaamonného R* se rozpustí v 10 ml *kyseliny sírové R*.

Molybdenan-kyselina sírová RS3

2,5 g *molybdenanu hexaamonného R* se zahřátím rozpustí v 20 ml *vody R*. Odděleně se za chlazení smíchá 28 ml *kyseliny sírové R* s 50 ml *vody R*. Po ochlazení se oba roztoky smíchají a zředí *vodou R* na 100 ml.

Uchovává se v nádobách z polyethylenu.

Molybdenan sodný R

$Na_2MoO_4 . 2H_2O$ M_r 242,0 CAS 10102-40-6

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky, je snadno rozpustný ve vodě.

Monomethylether ethylenglykol R

Viz *Methoxyethanol R*.

Morfiniumchlorid R

Viz článek *Morphini hydrochloridum*.

Morfolin R

C_4H_9NO M_r 87,1 CAS 110-91-8

Tetrahydro-1,4-oxazin

Bezbarvá hygroskopická hořlavá kapalina, dobře rozpustná ve vodě a v lihu 96%.

d_{20}^{20}: asi 1,01.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejméně 95 % předestiluje při 126 °C až 130 °C.

Myristicin R

$C_{11}H_{12}O_3$ M_r 192,2 CAS 607-91-0

5-Allyl-1-methoxy-2,3-methylendioxybenzen; 4-methoxy-6-(2-propenyl)-1,3-benzodioxol

Bezbarvá olejovitá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, těžce rozpustná v ethanolu, dobře rozpustná v etheru, mísitelná s toluenem a xylenem.

d_{20}^{20}: asi 1,144.

n_D^{20}: asi 1,540.

TV: 276 °C až 277 °C.

TT: asi 173 °C.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Anisi stellati fructus*. Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Uchovává se na chladném místě, chráněn před světlem.

Naftalen R

$C_{10}H_8$ M_r 128,2 CAS 91-20-3

Bílé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v etheru, dobře rozpustné v lihu 96%.

TT: asi 80 °C.

Při použití pro kapalinovou scintilaci má odpovídající analytickou jakost.

Naftochinonsulfonan sodný R

$C_{10}H_5NaO_5S$ M_r 260,2 CAS 521-24-4

Sodná sůl kyseliny 1,2-naftochinon-4-sulfonové

Žlutý až oranžovožlutý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Naftolbenzein R

$C_{27}H_{20}O_3$ M_r 392,5 CAS 6948-88-5

α,α-Bis(4-hydroxy-1-naftyl)benzylalkohol; α-naftolbenzein

Hnědočervený prášek nebo hnědočerné lesklé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v kyselině octové ledové a v lihu 96%.

Naftolbenzein RS

Roztok *naftolbenzeinu R* (2,0 g/l) v *kyselině octové ledové R*

Zkouška citlivosti. K 50 ml *kyseliny octové ledové R* se přidá 0,25 ml roztoku naftolbenzeinu. Roztok je zbarven žlutě. Ke vzniku zeleného zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS*.

1-Naftol R

$C_{10}H_8O$ M_r 144,2 CAS 90-15-3

α-Naftol

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé až bílé krystaly tmavnoucí vlivem světla. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 95 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

1-Naftol RS

0,10 g *1-naftolu R* se rozpustí ve 3 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (150 g/l) a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Připravuje se v čas potřeby.

2-Naftol R

$C_{10}H_8O$ M_r 144,2 CAS 135-19-3

β-Naftol

Bílé nebo slabě růžově zbarvené krystaly nebo plátky, velmi těžce rozpustné ve vodě, velmi snadno rozpustné v lihu 96%.

TT: asi 122 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

2-Naftol RS

5,0 g čerstvě překrystalizovaného *2-naftolu R* se rozpustí ve 40 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Připravuje se v čas potřeby.

Naftylamin R

$C_{10}H_9N$ M_r 143,2 CAS 134-32-7

1-Naftylamin

Bílý krystalický prášek měnící se na růžový působením světla a vzduchu, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 51 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Naftylethylendiamoniumdichlorid R

$C_{12}H_{16}Cl_2N_2$ M_r 259,2 CAS 1465-25-4

N-(1-Naftyl)ethylendiamoniumdichlorid

Může obsahovat krystalový methanol. Bílý až nažloutlý prášek, dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Natriumdokusat R

$C_{20}H_{37}NaO_7S$ M_r 444,6 CAS 577-11-7

Sodná sůl kyseliny dioktylsulfojantarové; dioktylsulfojantaran sodný

Voskovitá průhledná hmota nebo šupinky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Nerolidol R

$C_{15}H_{26}O$ M_r 222,4 CAS 1119-38-6

3,7,11-Trimethyldodeka-1,6,10-trien-3-ol

Světle žlutá kapalina, páchne slabě po konvalinkách, prakticky nerozpustná ve vodě a v glycerolu, mísitelná s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,876.

n_D^{20}: asi 1,479.

TT_{12}: 145 °C až 146 °C.

Při použití v plynové chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) postupem uvedeným v článku *Auranti amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 90,0 % celkové plochy píků.

Nerylacetat R

$C_{12}H_{20}O_2$ M_r 196,3 CAS 141-12-8

(*Z*)-3,7-Dimethylokta-2,6-dienylacetat

Bezbarvá olejovitá kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,907.

n_D^{20}: asi 1,460.

TV_{25}: asi 134 °C.

Při použití v plynové chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) postupem uvedeným v článku *Auranti amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 93,0 % celkové plochy píků.

Nikl Raneyův R

Obsahuje 48,0 % až 52,0 % hliníku (Al; A_r 26,98) a 48,0 až 52,0 % niklu (Ni; A_r 58,70).

Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v minerálních kyselinách. Používá se práškovaný (180).

Ninhydrin R

$C_9H_6O_4$ M_r 178,1 CAS 485-47-2

2,2-Dihydroxy-1,3-indandion

Bílý nebo velmi slabě žlutý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Uchovává se chráněn před světlem.

Ninhydrin RS

Roztok *ninhydrinu R* (2,0 g/l) ve směsi 5 objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a 95 objemových dílů *1-butanolu R*.

Ninhydrin RS1

1,0 g *ninhydrinu R* se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* a přidá se 10 ml *kyseliny octové ledové R*.

Ninhydrin RS2

3,0 g *ninhydrinu R* se rozpustí ve 100 ml roztoku *disiřičitanu sodného R* (45,50 g/l).

Ninhydrin RS3

Roztok *ninhydrinu R* (4,0 g/l) ve směsi 5 objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a 95 objemových dílů *1-butanolu R*.

Nitroanilin R

$C_6H_6N_2O_2$ M_r 138,1 CAS 100-01-6

4-Nitroanilin

Světle žlutý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný ve vroucí vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru. Se silnými minerálními kyselinami tvoří soli rozpustné ve vodě.

TT: asi 147 °C.

Nitrobenzaldehyd R

$C_7H_5NO_3$ M_r 151,1 CAS 552-89-6

2-Nitrobenzaldehyd

Žluté jehličky, těžce rozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96% a dobře rozpustné v etheru, těkají s vodní párou.
TT: asi 42 °C.

Nitrobenzaldehyd RS

K 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se přidá 0,12 g upráškovaného *nitrobenzaldehydu R*. 10 min se nechá v klidu za občasného protřepání, potom se zfiltruje. Připravuje se v čas potřeby.

Nitrobenzen R

$C_6H_5NO_2$ M_r 123,1 CAS 98-95-3

Bezbarvá nebo velmi slabě nažloutlá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.
TV: asi 211 °C.

Dinitrobenzen. K 0,1 ml se přidá 5 ml *acetonu R*, 5 ml *vody R* a 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. Protřepe se a nechá se stát. Horní vrstva je prakticky bezbarvá.

Nitrobenzoylchlorid R

$C_7H_4ClNO_3$ M_r 185,6 CAS 122-04-3

4-Nitrobenzoylchlorid

Žluté krystaly nebo krystalická hmota, rozpadávající se vlivem vlhkého vzduchu. Úplně se rozpouští v roztoku hydroxidu sodného za tvorby roztoku žlutooranžové barvy.
TT: asi 72 °C.

Nitrobenzylchlorid R

$C_7H_6ClNO_2$ M_r 171,6 CAS 100-14-1

4-Nitrobenzylchlorid

Světle žluté krystaly, slzotvorné, prakticky nerozpustné ve vodě, velmi snadno rozpustné v lihu 96% a v etheru.

4-(4-Nitrobenzyl)pyridin R

$C_{12}H_{10}N_2O_2$ M_r 214,2 CAS 1083-48-3

Žlutý prášek.
TT: asi 70 °C.

Nitroethan R

$C_2H_5NO_2$ M_r 75,1 CAS 79-24-3

Čirá olejovitá, bezbarvá kapalina.
TV: asi 114 °C.

Nitrofurantoin R

Viz článek *Nitrofurantoinum*.

(5-Nitro-2-furyl)methylendiacetat R

$C_9H_9NO_7$ M_r 243,2 CAS 92-55-7

Nitrofurfuraldiacetat; 5-nitrofurfulidendiacetat

Žluté krystaly.

TT: asi 90 °C.

Nitromethan R

CH_3NO_2 M_r 61,0 CAS 75-52-5

Čirá bezbarvá olejovitá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: 1,132 až 1,134.

n_D^{20}: 1,381 až 1,383.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejméně 95 % předestiluje při 100 °C až 103 °C.

Nitroprussid sodný R

$Na_2[Fe(CN)_5NO] . 2H_2O$ M_r 298,0 CAS 13755-38-9

Pentakyano-nitrosylželezitan sodný dihydrát

Červenohnědý prášek nebo krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Nitrosodipropylamin R

$C_6H_{14}N_2O$ M_r 130,2 CAS 621-64-7

Dipropylnitrosamin

Kapalina, dobře rozpustná v ethanolu, v etheru a v silných kyselinách.

d_{20}^{20}: asi 0,915.

TV: asi 78 °C.

Vhodná jakost pro chemiluminiscenční stanovení.

Nitrosodipropylamin RS

78,62 g *ethanolu R* se vstříkne přes zátku zapertlované lahvičky obsahující *nitrosodipropylamin R*. Zředí se 1: 100 *ethanolem R* a dá se po 0,5 ml do uzavřených zapertlovaných lahviček.

Uchovává se v temnu při 5 °C.

Nonan R

C_9H_{20} M_r 128,3 CAS 111-84-2

Bezbarvá čirá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,718.

n_D^{20}: 1,405 až 1,417.

TV: 150 °C až 151 °C.

Nordazepam R

$C_{15}H_{11}ClN_2O$ M_r 270,7 CAS 340-57-8

Demethyldiazepam; 7-chlor-2,3-dihydro-5-fenyl-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-on

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.
TV: asi 216 °C.

Norleucin R
$C_6H_{13}NO_2$ M_r 131,2 CAS 616-06-8

Kyselina (*RS*)-2-aminohexanová
Lesklé krystalky, mírně rozpustné ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustné v kyselinách.

Norpseudoefedriniumchlorid R
$C_9H_{14}ClNO$ M_r 187,7 CAS 53643-20-2

(1*R*,2*R*)- nebo (1*S*,2*S*)-(1-Fenyl-1-hydroxy-2-propyl)amoniumchlorid
Krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě.
TT: 180 °C až 181 °C.

Noskapiniumchlorid R

Viz článek *Noscapini hydrochloridum.*

Octan amonný R
$C_2H_7NO_2$ M_r 77,1 CAS 631-61-8

Bezbarvé, silně rozplývavé krystalky, velmi snadno rozpustné ve vodě a v lihu 96%.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Octan amonný RS

150 g *octanu amonného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidají se 3 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml.
Roztok je použitelný 1 týden.

Octan hořečnatý R
$C_4H_6MgO_4 . 4H_2O$ M_r 214,5 CAS 16674-78-5

Octan hořečnatý tetrahydrát
Bezbarvé rozplývavé krystalky, snadno rozpustné ve vodě a v lihu 96%.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Octan měďnatý R
$C_4H_6CuO_4 . H_2O$ M_r 199,7 CAS 142-71-2

Octan měďnatý monohydrát
Modrozelené krystaly nebo prášek, je snadno rozpustný ve vroucí vodě, dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru a v glycerolu (85 %).

Octan olovnatý R
$C_4H_6O_4Pb . 3H_2O$ M_r 379,3 CAS 6080-56-4

Octan olovnatý trihydrát
Bezbarvé na vzduchu větrající krystaly, snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96%.

Octan olovnatý RS

Roztok *octanu olovnatého R* (95 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R.*

Octan olovnatý zásaditý RS

CAS 1335-32-6

Roztok obsahuje 16,7 % až 17,4 % Pb (A_r 207,2). Olovo je přítomné ve formě octanu odpovídajícího přibližně vzorci $C_8H_{14}O_{10}Pb_3$.

40,0 g *octanu olovnatého R* se rozpustí v 90 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.* pH se upraví *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na 7,5. Roztok se odstřeďuje a použije se čirá bezbarvá supernatantní tekutina. Roztok zůstane čirý, je-li uchováván v dobře uzavřeném obalu.

Octan rtuťnatý R

$C_4H_6HgO_4$ M_r 318,7 CAS 1600-27-7

Bílé krystaly, snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96%.

Octan rtuťnatý RS

3,19 g *octanu rtuťnatého R* se rozpustí v *kyselině octové bezvodé R* a zředí se jí na 100 ml. Je-li třeba, roztok se neutralizuje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

Octan sodný bezvodý R

$C_2H_3NaO_2$ M_r 82,0 CAS 127-09-3

Bezbarvé krystalky nebo granule, velmi dobře rozpustné ve vodě, mírně rozpustné v lihu 96%.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %, suší se v sušárně při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti.

Octan sodný R

Viz článek *Natrii acetas*.

Octan zinečnatý R

$(C_2H_3O_2)_2Zn \cdot 2H_2O$ M_r 219,5 CAS 5970-45-6

Octan zinečnatý dihydrát

Jasně bílé krystaly, slabě zvětrávající, snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96%. Krystalovou vodu ztrácí při 100 °C.

d_{20}^{20}: asi 1,735.

TT: asi 237 °C.

Octan zinečnatý RS

600 ml *vody R* se smíchá se 150 ml *kyseliny octové ledové R*, 54,9 g *octanu zinečnatého R* a míchá se do rozpuštění. Pokračuje se v míchání až do přidání 150 ml *amoniaku 26% R.* Ochladí se na teplotu místnosti a upraví se hodnota pH na 6,4 *amoniakem 17,5% RS.* Směs se zředí *vodou R* na 1000 ml.

Oktanol R

$C_8H_{18}O$ M_r 130,2 CAS 111-87-5

1-Oktanol; n-kaprylalkohol

Bezbarvá kapalina, nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,828.

TV: asi 195 °C.

Oktansulfonan sodný R

$C_8H_{17}NaO_3S$ M_r 216,3 CAS 5324-84-5

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_8H_{17}NaO_3S$.

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo plátky. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu.

Absorbance (*2.2.25*). Měří se roztok (54 g/l); absorbance při 200 nm není větší než 0,10 a při 250 nm není větší než 0,01.

Oktoxinol 10 R

$C_{34}H_{62}O_{11}$ (průměrné složení) M_r 647 CAS 9002-93-1

α-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)fenyl]-ω-hydroxypoly(oxyethylen)

Čirá světle žlutá viskózní kapalina, mísitelná s vodou, s acetonem a s lihem 96%, dobře rozpustná v toluenu.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Oktylhydrogensíran sodný R

$C_8H_{17}NaO_4S$ M_r 232,3 CAS 142-31-4

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo vločky. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu.

Oleamid R

$C_{18}H_{35}NO$ M_r 281,5 CAS 301-02-0

(*Z*)-9-Oktadecenamid

Nažloutlý nebo bílý prášek nebo granule. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v ethanolu.

TT: asi 80 °C.

Olej kukuřičný R

Olej získaný z klíčků semen *Zea mays* L. lisováním nebo extrakcí.

Čirá světle žlutá až zlatožlutá kapalina, prakticky nerozpustná v lihu 96%, mísitelná s etherem a s etherem petrolejovým.

Číslo jodové (*2.5.4*). 103 až 128.

Číslo peroxidové (*2.5.5*). Nejvýše 5.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 187 až 195.

Totožnost. Zkouší se postupem uvedeným ve stati (*2.3.2*) Totožnost mastných olejů tenkovrstvou chromatografií. Získaný chromatogram odpovídá chromatogramu pro kukuřičný olej na obrázku *(2.3.2-1)*.

Olej olivový R

Viz článek *Olivae oleum*.

Olej řepkový R

Mastný olej získaný lisováním ze semen různých druhů *Brassica napus* L. Podíl mastných kyselin obsahuje 40 % až 55 % kyseliny erukové.

Čirá žlutá až tmavě žlutá kapalina, prakticky nerozpustná v lihu 96%, mísitelná s etherem a s etherem petrolejovým.

Číslo jodové (*2.5.4*). 94 až 120.

Číslo peroxidové (*2.5.5*). Nejvýše 5.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 168 až 181.

Kyselina eruková. Zkouší se postupem uvedeným ve zkoušce Cizí oleje v mastných olejích tenkovrstvou chromatografií (*2.4.21*) za použití následujících roztoků:

Roztok (a). 20 mg směsi mastných kyselin se rozpustí ve 4 ml *chloroformu R*.
Roztok (b). 2,0 ml roztoku (a) se zředí na 50,0 ml *chloroformem R*.

Na chromatogramu roztoku (a) je pět zřetelných skvrn. Skvrna s nejnižší hodnotou R_F (asi 0,25) je nejintenzivnější nebo jedna z nejintenzivnějších a odpovídá kyselině erukové. Skvrna odpovídající kyselině erukové je zřetelně viditelná na chromatogramu roztoku (b).

Olej slunečnicový R

Viz článek *Oleum helianthi.*

Olovnatan draselný RS

1,7 g *octanu olovnatého R*, 3,4 g *citronanu draselného R* a *50 g hydroxidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Oranž methylová sodná sůl R

$C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ M_r 327,3 CAS 547-58-0

Colour Index 13025, Schultz 176
Methyloranž, sodná sůl kyseliny 4′-dimethylaminoazobenzen-4-sulfonové

Oranžově žlutý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96 %.

Oranž methylová RS

0,1 g *oranže methylové sodné soli R* se rozpustí v 80 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. Směs 0,1 ml roztoku oranže methylové a 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* je žlutá. Ke změně zbarvení na červené se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*.

Barevný přechod. Při pH 3,0 až pH 4,4 z červené do žluté.

Oranž methylová směsný indikátor RS

20 mg *oranže methylové sodné soli R* a 0,1 g *zeleně bromkresolové R* se rozpustí v 1 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Barevný přechod. Při pH 3,0 až pH 4,4 z oranžové do olivově zelené.

Oranž xylenolová R

$C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$ M_r 761 CAS 3618-43-7

Tetrasodná sůl S,S-dioxidu kyseliny 3,3′-(3*H*-2,1-benzoxanthiol-3-yliden)bis[(6-hydroxy-5-methyl-3,1-fenylen)methyleniminobisoctové

Červenohnědý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě.

Oranž xylenolová s dusičnanem draselným R

1 díl *oranže xylenolové R* se rozetře s 99 díly *dusičnanu draselného R.*

Zkouška citlivosti. K 50 ml *vody R* se přidá 1 ml *kyseliny octové zředěné RS,* 50 mg oranže xylenolové s dusičnanem draselným a 0,05 ml *dusičnanu olovnatého RS.* Ke směsi se přidá tolik *methenaminu R*, až se žluté zbarvení změní na fialově červené. Po přidání 0,1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* se zbarvení změní na žluté.

Oxid arsenitý R

As_2O_3 M_r 197,8 CAS 1327-53-3

Krystalický prášek nebo bílá hmota, těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná ve vroucí vodě.

Oxid dusný R

N_2O M_r 44,01 CAS 10024-97-2

Obsahuje nejméně 99,99 % *(V/V)* N_2O.

Oxid dusnatý. Méně než 1 ml/m^3.

Oxid uhelnatý. Méně než 1 ml/m^3.

Oxid dusnatý R

NO M_r 30,01 10102-43-9

Obsahuje nejméně 98,0 % *(V/V)* NO.

Oxid fosforečný R

P_2O_5 M_r 141,9 CAS 1314-56-3

Bílý amorfní rozplývající se prášek. Hydratuje s vodou za uvolnění tepla.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Oxid hlinitý aktivovaný R

CAS 1344-28-1

Oxid hlinitý, který se zahřátím odvodní a aktivuje.
Velikost částic 75 μm až 150 μm.

Oxid holmitý R

Ho_2O_3 M_r 377,9 CAS 12055-62-8

Nažloutlý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě.

Oxid hořečnatý těžký R

Viz článek *Magnesii oxidum ponderosum.*

Oxid hořečnatý R

Viz článek *Magnesii oxidum leve.*

Oxid hořečnatý R1

Vyhovuje požadavkům předepsaným pro *oxid hořečnatý R* a následujícím zkouškám:

Arsen (*2.4.2*). 0,5 g se rozpustí ve směsi 5 ml *vody R* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS.* Roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,75 g se rozpustí ve směsi 3 ml *vody R* a 7 ml *kyseliny chlorovodíkové RS.* Přidá se 0,05 ml *fenolftaleinu RS* a tolik *amoniaku 26% R*, dokud se tvoří růžové zbarvení. Přebytek amoniaku se neutralizuje přidáním *kyseliny octové ledové R*, přidá se 0,5 ml jejího nadbytku a zředí se *vodou R* na 15 ml. Pokud je potřeba, filtruje se. 12 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 5 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)* a 5 ml *vody R.*

Železo (*2.4.9*). 0,2 g se rozpustí v 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Oxid chromový R

CrO_3 M_r 100,0 CAS 1333-82-0

Tmavě hnědočervené jehličky nebo granule, rozplývající se. Je velmi snadno rozpustný ve vodě.

Uchovává se ve vzduchotěsných skleněných obalech.

Oxid jodičný rekrystalizovaný R

I_2O_5 M_r 333,8 CAS 12029-98-0

Obsahuje nejméně 99,5 % I_2O_5.

Bílý krystalický prášek nebo bílá až šedobílá zrnka. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě za tvorby HIO_3.

Stálost při zahřívání. 2,0 g látky předem sušené 1 h při 200 °C se rozpustí v 50 ml *vody R;* roztok je bezbarvý.

Stanovení obsahu. 0,100 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidají se 3,0 g *jodidu draselného R* a 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,782 mg I_2O_5.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Oxid olovičitý R

PbO_2 M_r 239,2 CAS 1309-60-0

Tmavě hnědý prášek, který po zahřátí uvolňuje kyslík. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v kyselině chlorovodíkové za vzniku chloru, rozpustný ve zředěné kyselině dusičné za přítomnosti peroxidu vodíku, kyseliny šťavelové nebo jiných redukujících látek, dobře rozpustný za tepla v koncentrovaných roztocích alkalických hydroxidů.

Oxid osmičelý R

OsO_4 M_r 254,2 CAS 20816-12-0

Žlutá krystalická látka nebo jasně žluté jehličkovité krystaly, je hygroskopický, citlivý na světlo, dobře rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Oxid osmičelý RS

Roztok (2,5 g/l) v *kyselině sírové 0,05 mol/l RS.*

Oxid rtuťnatý R

HgO M_r 216,6 CAS 21908-53-2

Žlutý až oranžovožlutý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Uchovává se chráněn před světlem.

Oxid siřičitý R

SO_2 M_r 64,1 CAS 7446-09-5

Bezbarvý plyn, který stlačením tvoří bezbarvou kapalinu.

Oxid stříbrný R

Ag_2O M_r 231,7 CAS 20667-12-3

Hnědočerný prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%, snadno rozpustný ve zředěné kyselině dusičné a v roztoku amoniaku.

Uchovává se chráněn před světlem.

Oxid uhelnatý R

CO M_r 28,01 CAS 630-08-0

Obsahuje nejméně 99,97 % (*V/V*) CO.

Oxid uhličitý R

Viz článek *Carbonei dioxidum.*

Oxid uhličitý R1

Obsahuje nejméně 99,995 % (*V/V*) CO_2.

Oxid uhelnatý. Méně než 5 ml/m^3.

Kyslík. Méně než 25 ml/m^3.

Oxid vanadičný R

V_2O_5 M_r 181,9 CAS 1314-62-1

Obsahuje nejméně 98,5 % V_2O_5.

Žlutohnědý až červenohnědý prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v koncentrovaných minerálních kyselinách a v roztocích alkalických hydroxidů za tvorby solí.

Vzhled roztoku. 1,0 g se zahřívá 30 min s 10 ml *kyseliny sírové R.* Po ochlazení se zředí stejnou kyselinou na 10 ml. Tento roztok je čirý (*2.2.1*).

Zkouška citlivosti s peroxidem vodíku. 1,0 ml roztoku ze zkoušky Vzhled roztoku se opatrně zředí *vodou R* na 50,0 ml (zkoušený roztok). K 0,5 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml roztoku *peroxidu vodíku R (*0,1 g/l H_2O_2). Tento roztok v porovnání s kontrolním roztokem připraveným z 0,5 ml zkoušeného roztoku a 0,1 ml *vody R* je zřetelně oranžově zbarven. Po přidání 0,4 ml roztoku *peroxidu vodíku R* (0,1 g/l H_2O_2) se změní zbarvení na oranžově žluté.

Ztráta žíháním. Nejvýše 1 %; žíhá se 1,00 g při 700 °C.

Stanovení obsahu. 0,200 g se rozpustí zahřátím ve 20 ml roztoku *kyseliny sírové R* (70%). Po přidání 100 ml *vody R* se přidává *manganistan draselný 0,02 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení. Nadbytek manganistanu draselného se odstraní pomocí roztoku *dusitanu sodného R* (30 g/l). Přidá se 5,0 g *močoviny R* a 80 ml roztoku *kyseliny sírové R* (70%) se roztok ochladí, přidá se 0,1 ml *feroinu RS* a ihned se titruje *síranem železnatým 0,1 mol/l VS* do vzniku zelenočerveného zbarvení.

1 ml *síranu železnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,095 mg V_2O_5.

Oxid vanadičný v kyselině sírové RS

0,20 g *oxidu vanadičného R* se rozpustí ve 4 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Oxid zinečnatý R

Viz článek *Zinci oxidum.*

Pankreatinový prášek R

Viz článek *Pancreatis pulvis*.

Papaveriniumchlorid R

Viz článek *Papaverini hydrochloridum.*

Papír lakmusový modrý R

10 dílů hrubě práškovaného *lakmusu R* se vaří se 100 díly *lihu 96% R.* Líh se dekantuje a ke zbytku se přidá směs objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (45 + 55). Nechá se stát 2 dny a potom se dekantuje čirá tekutina. Pásky filtračního papíru se impregnují tímto výluhem a nechají se vysušit.

Zkouška citlivosti. Páska o rozměru 10 mm x 60 mm se ponoří do směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l RS* a 90 ml *vody R.* Za stálého míchání papír v průběhu 45 s změní zbarvení na červené.

Papír lakmusový červený R

K výluhu získanému v odstavci *Papír lakmusový modrý R* se přidává po kapkách *kyselina chlorovodíková zředěná RS* do vzniku červeného zbarvení. Pásky filtračního papíru se impregnují tímto roztokem a nechají se vysušit.

Zkouška citlivosti. Páska o rozměru 10 mm x 60 mm se ponoří do směsi 10 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l RS* a 90 ml *vody R*. Za stálého míchání papír v průběhu 45 s změní zbarvení na modré.

Papír nitrobenzaldehydový R

0,20 g *nitrobenzaldehydu R* se rozpustí v 10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l). Tento roztok je použitelný 1 h. Spodní polovina pásku z pomalého filtračního papíru o rozměru 10 cm x 0,8 cm až 1 cm se ponoří do roztoku a jeho přebytek se odstraní mezi dvěma filtračními papíry. Nitrobenzaldehydový papír je použitelný několik minut po přípravě.

Papír s bromidem rtuťnatým R

Do pravoúhlé misky obsahující roztok *bromidu rtuťnatého R* (50 g/l) v *ethanolu R* se ponoří páska bílého filtračního papíru (hustota 80 g/m^2, filtrační rychlost 40 s až 60[1] s o rozměru 1,5 cm x 20 cm (dvakrát složena). Páska se nechá odkapat a vysušit ve tmě zavěšená na nekovovém vlákně. Odstřihne se 1 cm z každého přeloženého a protilehlého konce papíru, zbytek se stříhá na čtvercové (1,5 cm x 1,5 cm) nebo kruhové (průměr 1,5 cm) kousky. Uchovává se v nádobě se skleněným uzávěrem, obalené černým papírem.

Papír se zelení methylovou R

Páska vhodného filtračního papíru se ponoří do roztoku *zeleně methylové R* (40 g/l) a potom se vysuší volně na vzduchu. Pak se impregnuje 1 h roztokem *jodidu draselného R* (140 g/l) a roztokem *jodidu rtuťnatého R* (200 g/l). Páska se promývá *vodou destilovanou R*, až je voda bezbarvá, a vysuší se volně na vzduchu. Uchovává se chráněn před světlem, je použitelný 48 h.

Papír se síranem manganatým a dusičnanem stříbrným R

Pruh pomalého filtračního papíru se smočí v roztoku *síranu manganatého R* (8,5 g/l) a *dusičnanu stříbrného R* (8,5 g/l). Podrží se několik min a nechá se sušit nad *oxidem fosforečným R* za chránění před kyselými a alkalickými parami.

Papír se žlutí titanovou R

Proužky filtračního papíru se ponoří na několik minut do *žluti titanové RS*. Potom se vysuší při pokojové teplotě.

Papír s octanem olovnatým R

Bílý filtrační papír (80 g/m^2) se ponoří do směsi objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *octanu olovnatého RS* (1 + 10). Po vysušení se papír rozstříhá na malé pásky o rozměru 15 mm x 40 mm.

---

[1] Filtrační rychlost je vyjádřená časem, ve kterém se přefiltruje 100 ml vody při 20 °C přes filtrační plochu 10 cm^2 za konstantního tlaku 6,7 kPa.

Papír škrobový s jodičnanem draselným R

Pásky filtračního papíru se ponoří do 100 ml *škrobu prostého jodidu RS* obsahujícího 0,1 g *jodičnanu draselného R*. Nechá se odkapat, pak se vysuší ve tmě.

Paracetamol R

Viz článek *Paracetamolum.*

Paracetamol prostý 4-aminofenolu R

Paracetamol R se nechá rekrystalizovat ve *vodě R* a vysuší se ve vakuu při 70 °C. Postup se opakuje, až látka vyhoví následující zkoušce: 5,0 g vysušené látky se rozpustí ve směsi složené ze stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R*, potom se stejnou směsí zředí na 100 ml. Přidá se 1 ml čerstvého připraveného roztoku obsahujícího ve 100 ml 1,0 g *nitroprussidu sodného R* a 1,0 g *uhličitanu sodného bezvodého R*. Směs se promíchá a nechá se v klidu 30 min, chráněna před světlem. Přitom nevznikne modré nebo zelené zabarvení.

Parafin bílý měkký R

Polotuhá směs uhlovodíků získaná z nafty, bělená, prakticky nerozpustná ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustná v etheru a v *etheru petrolejovém R1*. Roztoky někdy vykazují mírnou opalescenci.

Parafin tekutý R

Viz článek *Paraffinum liquidum.*

Pararosaniliniumchlorid R

$C_{19}H_{18}ClN_3$ M_r 323,8 CAS 569-61-9

Colour Index 42500, Schultz 779

4-[Bis(4-aminofenyl)methylen]-2,5-cyklohexadieniminiumchlorid

Modravě červený krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru. Roztoky ve vodě a v ethanolu jsou tmavočerveně zbarvené. Roztoky v kyselině chlorovodíkové a kyselině sírové jsou zbarvené žlutě.

TT: asi 270 °C, za rozkladu.

Pararosanilin odbarvený roztok RS

0,10 g *pararosaniliniumchloridu R* se přenese do kuželové baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 60 ml *vody R* a roztok 1,0 g *siřičitanu sodného bezvodého R*, nebo 2,0 g *siřičitanu sodného R*, nebo 0,75 g *disiřičitanu sodného R* v 10 ml *vody R*. Za třepání se pomalu přidá 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Baňka se uzavře a třepe se až do úplného rozpuštění. Roztok se zředí *vodou R* na 100 ml a nechá se stát 12 h před použitím.

Uchovává se chráněn před světlem.

Penicilinasa RS

10 g hydrolyzátu kaseinu, 2,72 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 5,88 g *citronanu sodného R* se rozpustí ve 200 ml *vody R*, pH se upraví na 7,2 roztokem *hydroxidu sodného R* (200 g/l) a zředí se *vodou R* na 1000 ml. 0,41 g *síranu hořečnatého R* se rozpustí v 5 ml *vody R*,

přidá se 1 ml roztoku *síranu amonno-železnatého R* (1,6 g/l), potom se zředí *vodou R* na 10 ml. Oba roztoky se sterilizují v autoklávu, ochladí se a smíchají. Směs se rozdělí do kuželových baněk v dostatečné vrstvě a naočkuje se *Bacillus cereus* (NCTC No 9946). Baňky se nechají v klidu při 18 °C až 37 °C až do prvních známek růstu a udržují se 16 h při 35 °C až 37 °C za neustálého protřepávání a provzdušňování. Směs se odstřeďuje a supernatantní tekutina se sterilizuje membránovou filtrací. 1 ml roztoku penicilinasy obsahuje při 30 °C a pH 7,0 0,4 mikrokatalu (což odpovídá hydrolýze 500 mg benzylpenicilinu na kyselinu benzylpenicilanovou za hodinu) za předpokladu, že koncentrace benzylpenicilinu neklesne pod úroveň potřebného enzymatického nasycení. Michaelisova konstanta penicilinasy v roztoku pro benzylpenicilin činí 12 μg/ml.

Sterilita (*2.6.1*). Roztok penicilinasy vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovává se při teplotě 0 °C až 2 °C. Použije se během 2 až 3 dnů. V lyofilizovaném stavu v zatavených ampulkách může být látka uchovávána několik měsíců.

Pentanol R

$C_5H_{12}O$ M_r 88,1 CAS 71-41-0

1-Pentanol

Bezbarvá kapalina, mírně rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

n_D^{20}: asi 1,410.

TV: asi 137 °C.

Pentan R

C_5H_{12} M_r 72,2 CAS 109-66-0

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s acetonem, s ethanolem a etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,63.

n_D^{20}: asi 1,359.

TV: asi 36 °C.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následující zkoušce:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 20 % při 200 nm, nejméně 50 % při 210 nm, nejméně 85 % při 220 nm, nejméně 93 % při 230 nm, nejméně 98 % při 240 nm, měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Pentansulfonan sodný R

$C_5H_{11}NaO_3S$ M_r 174,2 CAS 22767-49-3

Bílá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě.

Peroxid vodíku koncentrovaný R

Viz článek *Hydrogenii peroxidum 30%.*

Peroxid vodíku zředěný RS

Viz článek *Hydrogenii peroxidum 3%.*

Peroxodisíran diamonný R

$(NH_4)_2S_2O_8$ M_r 228,2 CAS 7727-54-0

Bílý krystalický prášek nebo zrnité krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě.

Peroxodisíran didraselný R

$K_2S_2O_8$ M_r 270,3 CAS 7727-21-1

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky, je mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Vodný roztok se při teplotě místnosti rozkládá, rychleji se rozkládá při zahřívání.

Uchovává se v chladu.

Petrolether R

Viz *Ether petrolejový R.*

α-Pinen R

$C_{10}H_{16}$ M_r 136,2 CAS 80-56-8

2,6,6-Trimethylbicyklo[3,1,1]-2-hepten

Bezbarvá čirá kapalina, dobře rozpustná v mastných olejích.

d_{20}^{20}: 0,854 až 0,860.

n_D^{20}: 1,466 až 1,467.

TV: 155 °C až 156 °C.

β-Pinen R

$C_{10}H_{16}$ M_r 136,2 CAS 127-91-3

6,6-Dimethyl-2-methylenbicyklo[3,1,1]heptan

Bezbarvá olejovitá kapalina, páchnoucí po terpentýnu, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.

d_4^{20}: asi 0,859.

n_D^{20}: asi 1,474.

TV: 165 °C až 167 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* postupem uvedeným v článku *Aurantii amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku odpovídajícího β-pinenu je nejméně 99,0 % celkové plochy píků.

Piperazin hexahydrát R

Viz článek *Piperazinum hexahydricum.*

Piperidin R

$C_5H_{11}N$ M_r 85,2 CAS 110-89-4

Hexahydropyridin

Bezbarvá nebo nažloutlá kapalina, alkalické reakce, mísitelná s vodou, s lihem 96%, s etherem a s etherem petrolejovým.

TV: asi 106 °C.

Písek R

Bílá nebo slabě šedá zrnka křemene o velikosti částic 150 μm až 300 μm.

Plazma substrát R

Ze směsi roztoku *citronanu sodného R* (38 g/l) a lidské nebo hovězí krve v objemovém poměru 1: 9 nebo ze směsi obsahující roztok *hydrogencitronanu sodného R* (20 g/l) a roztok *glukosy R* (25 g/l) a krve v objemovém poměru 2: 7 se oddělí plazma. V prvním případě se může substrát plazmy připravit v den odběru, v druhém případě se může substrát plazmy připravit do 2 dní po odběru.

Uchovává se při -20 °C.

Plazma substrát R1

Na odběr krve a její zpracování se použije zařízení z plastické hmoty nebo silikonem potaženého skla (nesmáčivé vodou).

Odebere se vhodný objem krve od každé z nejméně pěti ovcí; je vhodné odebrat 285 ml do 15 ml antikoagulačního roztoku, ale může se odebrat i menší objem. Odebírá se ze živých zvířat nebo v okamžiku jejich poražení, pomocí jehly připojené ke kanyle tak dlouhé, aby dosahovala na dno odběrové nádobky. Odstraní se několik prvních mililitrů a odebere se volně tekoucí krev. Odebraná krev se smíchá s vhodným množstvím antikoagulačního roztoku obsahujícího 8,7 g *citronanu sodného R* a 4 mg *aprotininu R* ve 100 ml *vody R* v poměru 19 objemových dílů krve na 1 objemový díl antikoagulačního roztoku. V době odběru a bezprostředně po něm se nádoba míchá krouživým pohybem tak, aby vznikla homogenní směs bez vytvoření pěny. Po ukončení odběru se nádoba uzavře a ochladí na 10 °C až 15 °C. Po ochlazení se krev ze všech nádob smíchá, s výjimkou krve, která projevuje zjevnou hemolýzu nebo sraženinu. Smíchaná krev se uchovává při teplotě 10 °C až 15 °C.

Tak brzo, jak je to možné, a do 4 h po odběru se smíchaná krev odstřeďuje po dobu 30 min při 10 °C až 15 °C při 1000 g_n až 2000 g_n. Supernatantní tekutina se oddělí a odstřeďuje se po dobu 30 min při 5000 g_n. (Na vyčeření plazmy se může použít rychlejší odstřeďování, např. při 20 000 g_n po dobu 30 min, a již se nefiltruje.) Supernatantní tekutina se oddělí, ihned se opatrně promíchá a rozdělí do malých nádob s uzávěrem. Velikost nádobek musí stačit na kompletní stanovení heparinu (např. 10 ml až 30 ml). Uzavřené nádobky s plazmou se dají ihned zmrazit při teplotě nižší než -70 °C (např. ponořením do tekutého dusíku) a uchovávají se při teplotě nižší než -30 °C.

Plazma připravená za těchto podmínek se může použít jako substrát plazmy na stanovení heparinu tehdy, když se za podmínek stanovení u použité metody naměří vhodný čas srážení a jestliže dává reprodukovatelnou strmou křivku - odpověď/log. dávky.

V čas potřeby se určité množství substrátu plazmy rozmrazí ve vodní lázni při 37 °C za pomalého míchání až do úplného rozmrazení. Jednou rozmrazená plazma se udržuje při 10 °C až 20 °C a ihned se použije. Je-li to nutné, může se rozmrazený substrát plazmy mírně odstřeďovat, filtrace se nepoužije.

Plazma substrát RS2

Oddělená plazma z lidské krve, která byla odebrána a smíchána s roztokem *citronanu sodného R* (38 g/l) v objemovém poměru 9: 1 a u které je hodnota faktoru IX nižší než 1 % normální hodnoty.

Uchovává se v malých množstvích ve zkumavkách z plastické hmoty při teplotě -30 °C nebo nižší.

Plazma chudá na krevní destičky R

Odebere se 45 ml lidské krve 50ml injekční stříkačkou z plastické hmoty do 5,0 ml sterilního roztoku *citronanu sodného R* (38 g/l). Ihned se odstřeďuje 30 min při 1550 g_n a 4 °C. Injekční stříkačkou z plastické hmoty se odeberou dvě třetiny supernatantní tekutiny a ihned se odstřeďuje 30 min při 3500 g_n a 4 °C. Injekční stříkačkou z plastické hmoty se odeberou dvě třetiny supernatantní tekutiny, která se rychle zmrazí ve vhodném množství ve zkumavkách z plastické hmoty na -40 °C nebo nižší teplotu. Při přípravě se používají pomůcky z plastické hmoty nebo potažené silikonem.

Plazma králičí R

Krev se odebere intrakardiální punkcí z králíka hladovějícího 12 h za použití injekční stříkačky z plastické hmoty s kanylou č. 1 obsahující takové množství roztoku *citronanu sodného R* (38 g/l), aby konečný poměr objemů roztoku citronanu a krve byl 1: 9. Plazma se oddělí při 15 °C až 20 °C odstřeďováním při 1500 g_n až 1800 g_n po dobu 30 min.

Uchovává se při 0 °C až 6 °C. Použije se během 4 h po přípravě.

Plazma substrát prostá faktoru V R

Upřednostňuje se plazma s vrozeným deficitem faktoru V, nebo se připraví následovně: směs objemových dílů roztoku *šťavelanu sodného R* (13,4 g/l) a lidské krve (1 + 10) se odstřeďuje, oddělí se plazma a inkubuje se při 37 °C po dobu 24 h až 36 h. Čas srážení plazmy, stanovený předepsanou metodou v odstavci *Faktor koagulační V R*, má být 70 s až 100 s. Pokud je čas srážení menší než 70 s, potom se plazma inkubuje znovu po dobu 12 h až 24 h.

Uchovává se v malých množstvích, při teplotě -20 °C nebo nižší.

Poly(difenyl)(dimethyl)(divinyl)siloxan R

Obsahuje 94 % methylových skupin, 5 % fenylových skupin a 1 % vinylových skupin (SE54).
Stacionární fáze pro plynovou chromatografii.

Poly(difenyl)(dimethyl)siloxan R

Obsahuje 95 % methylových skupin a 5 % fenylových skupin (DB-5, SE52).
Stacionární fáze pro plynovou chromatografii.

Poly(fenylmethyl)(kyanopropyl)siloxan R

90 % kyanopropylových a 10 % fenylmethylových skupin.
Stacionární fáze pro plynovou chromatografii.

Poly(kyanopropyl)(methylfenylmethyl)siloxan R

Střední M_r 8000. Obsahuje 25 % kyanopropylových, 25 % fenylových a 50 % methylových skupin. Je to velmi viskózní kapalina (viskozita asi 9000 mPs.s).
$\boldsymbol{d_{25}^{25}}$: asi 1,10.
$\boldsymbol{n_D^{25}}$: asi 1,502.

Poly(kyanopropyl)siloxan R

Obsahuje 100 % kyanopropylových skupin.

Polydimethylsiloxan R

Poly[oxy(dimethylsilandiyl)]; dimeticon

Bezbarvý organokřemičitý polymer konzistence polotekuté pryže.

Vnitřní viskozita. Asi 115 ml/g; stanoví se následovně: s přesností 0,1 mg se naváží do 100ml odměrných baněk 1,5 g, 1,0 g a 0,3 g zkoušené látky. Přidá se 40 ml až 50 ml *toluenu R* a třepe se až do úplného rozpuštění. Potom se zředí po značku. Stanoví se viskozita každého roztoku (*2.2.9*). Za stejných podmínek se stanoví viskozita *toluenu R*. Koncentrace každého roztoku se zředí na polovinu *toluenem R*.

Stanoví se viskozita zředěných roztoků, přičemž:

c - koncentrace zkoušené látky v g/100 ml,
t_1 - čas průtoku zkoušeného roztoku v s,
t_2 - čas průtoku toluenu v s,
η_1 - viskozita zkoušeného roztoku v mPa.s,
η_2 - viskozita toluenu v mPa.s,
d_1 - relativní hustota zkoušeného roztoku,
d_2 - relativní hustota toluenu.

Pro hustotu se použijí následující hodnoty:

Koncentrace v g/100 ml	Relativní hustota (d_1)
0 - 0,5	1,000
0,5 - 1,25	1,001
1,25 - 2,20	1,002
2,20 - 2,75	1,003
2,75 - 3,20	1,004
3,20 - 3,75	1,005
3,75 - 4,50	1,006

Specifická viskozita se vypočítá ze vztahu:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_1 - \eta_2}{\eta_2} = \frac{t_1 \cdot d_1}{t_2 \cdot d_2} .$$

Redukovaná viskozita se vypočítá podle vztahu:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} .$$

Vnitřní viskozita (η) se vypočítá extrapolací předcházející rovnice pro $c = 0$. K tomu se sestrojí křivka jako funkce "c":

$$\frac{\eta_{sp}}{c} \text{ nebo } \log \frac{\eta_{sp}}{c} .$$

Hodnota získaná extrapolací k $c = 0$ vynásobená 100 je vnitřní viskozita (η) vyjádřená v ml/g.

Infračervené spektrum (*2.2.24*) substance dispergované v několika kapkách *chloridu uhličitého R* a nanesené mezi destičky chloridu sodného nevykazuje při 3050 cm^{-1} absorpci odpovídající vinylovým skupinám.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší 15 min ve vakuu při 350 °C. Nejvýše 0,8 %; 2,000 g se suší 2 h při 200 °C.

Polyetherhydroxylovaný gel pro chromatografii R

Gel s malou velikostí částic a hydrofilním povrchem s hydroxylovými skupinami. Hranice vyloučení pro dextran je relativní molekulová hmotnost $2 . 10^5$ až $2,5 . 10^6$.

Polyethylenglykol 1500 R

Viz *Makrogol 1500 R.*

Polyfenylmethylsiloxan R

střední M_r 4000

Obsahuje 50 % methylových skupin, 50 % fenylových skupin. Velmi viskózní kapalina (viskozita asi 1300 mPa.s). Stacionární fáze pro plynovou chromatografii.
d_{25}^{25}: asi 1,09.
n_D^{25}: asi 1,540.

Polysorbát 20 R

Viz článek *Polysorbatum 20.*

Polysorbát 80 R

Viz článek *Polysorbatum 80.*

Poly[fenyl(5)methyl(94)vinyl(1)]siloxan R

Polysiloxan obsahující 5 % fenylových skupin, 94 % methylových skupin a 1 % vinylových skupin.

Poly[fenyl(5)methyl(95)]siloxan R

Polysiloxan obsahující 5 % fenylových skupin a 95 % methylových skupin.

Povidon R

Viz článek *Povidonum.*

D-Prolyl-L-fenylalanyl-L-arginin-4-nitroanilid dihydrochlorid R

$C_{26}H_{36}Cl_2N_8O_5$ M_r 612

Propanolamin R

C_3H_9NO M_r 75,1 CAS 156-87-6

3-Amino-1-propanol

Čirá bezbarvá viskózní kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,99.

n_D^{20}: asi 1,461.

TT: asi 11 °C.

1-Propanol R

C_3H_8O M_r 60,1 CAS 71-23-8

Čirá bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

d_{20}^{20}: 0,802 až 0,806.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejméně 95,0 % předestiluje při 96 °C až 99 °C.

2-Propanol R

C_3H_8O M_r 60,1 CAS 67-63-0

Isopropanol; isopropylalkohol

Čirá bezbarvá kapalina, snadno zápalná, mísitelná s vodou a lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,785.

TV: 81 °C až 83 °C.

2-Propanol R1

Vyhovuje požadavkům uvedeným v odstavci *2-Propanol R* a následujícím požadavkům.

n_D^{20}: asi 1,378.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,05 %; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

Transmitance (2.2.25). Nejméně 25 % při 210 nm, nejméně 55 % při 220 nm, nejméně 75 % při 230 nm, nejméně 95 % při 250 nm, nejméně 98 % při 260 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Propionaldehyd R

C_3H_6O M_r 58,1 CAS 123-38-6

Propanal

Kapalina snadno rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,81.

n_D^{20}: asi 1,365.

TT: asi -81 °C.

TV: asi 49 °C.

Propylacetat R

$C_5H_{10}O_2$ M_r 102,1 CAS 109-60-4

d_{20}^{20}: asi 0,888.

TT: asi -95 °C.

TV: asi 102 °C.

Propylenglykol R

Viz článek *Propylenglycolum*.

Propylparaben R

Viz článek *Propylparabenum*.

Protaminiumsulfat R

Viz článek *Protamini sulfas*.

Pulegon R

$C_{10}H_{16}O$ M_r 152,2 CAS 89-82-7

(+)-*p*-Menth-4-en-3-on; (*R*)-2-isopropyliden-5-methylcyklohexanon

Olejovitá bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a etherem.

d_{15}^{20}: asi 0,936.

n_D^{20}: 1,485 až 1,489.

$[\alpha]_D^{20}$: 19,5° až 22,5°.

TV: 222 °C až 224 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Menthae piperitae etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 98,0 % z celkové plochy píků.

Pyridin bezvodý R

CAS 110-86-1

Pyridin R se vysuší nad *uhličitanem sodným bezvodým R*, filtruje se a destiluje.

Voda (2.5.12). Nejvýše 0,01 %.

Pyridin R

C_5H_5N M_r 79,1 CAS 110-86-1

Čirá bezbarvá kapalina, hygroskopická, mísitelná s vodou a lihem 96%.

TV: asi 115 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

2-Pyridylamin R

$C_5H_6N_2$ M_r 94,1 CAS 504-29-0

2-Aminopyridin

Velké krystaly, dobře rozpustné ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

TT: asi 58 °C.

TV: asi 210 °C.

Pyridylazonaftol R

$C_{15}H_{11}N_3O$ M_r 249,3 CAS 85-85-8

1-(2-Pyridylazo)-2-naftol

Cihlově červený prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, v methanolu a zředěných horkých roztocích alkalických hydroxidů.

TT: asi 138 °C.

Pyridylazonaftol RS

Roztok 1,0 g/l v *ethanolu R*.

Zkouška citlivosti. K 50 ml *vody R* se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,4*, 0,10 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l VS* a 0,25 ml roztoku pyridylazonaftolu. Po přidání 0,15 ml roztoku *síranu měďnatého R* (5 g/l) se světle žluté zbarvení změní na fialové.

Pyrogallol R

$C_6H_6O_3$ M_r 126,1 CAS 87-66-1

1,2,3-Benzentriol; 1,2,3-trihydroxybenzen

Bílé krystaly tmavnoucí na vzduchu a na světle, velmi snadno rozpustné ve vodě, v lihu 96% a etheru, těžce rozpustné v sirouhlíku. Vodné roztoky na vzduchu a rychleji roztoky alkalické hnědnou absorpcí kyslíku.

TT: asi 131 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Pyrogallol zásaditý RS

0,50 g *pyrogallolu R* se rozpustí ve 2 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. 12 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v 8 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Tyto dva roztoky se smíchají těsně před použitím.

Pyrokatechol R

$C_6H_6O_2$ M_r 110,1 CAS 120-80-9

1,2-Benzendiol; 1,2-dihydroxybenzen

Bezbarvé nebo slabě nažloutlé krystaly, dobře rozpustné ve vodě, v lihu 96%, v acetonu a v etheru.

TT: asi 102 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Pyrrolidinyldithiokarbamat amonný R

$C_5H_{12}N_2S_2$ M_r 164,3 CAS 5108-96-3

Amonium-1-pyrrolidinyldithioformat

Bílý až slabě žlutý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se v nádobách obsahujících bavlněný sáček s uhličitanem amonným.

Reineckova sůl R

$NH_4[Cr(NH_3)_2(NCS)_4] \cdot H_2O$ M_r 354,4 CAS 13573-16-5

Diammin-tetrakis(isothiokyanatano)chromitan amonný monohydrát

Červený prášek nebo krystaly, je mírně rozpustný ve studené vodě, dobře rozpustný v teplé vodě a v lihu 96%.

Reineckova sůl RS

Roztok 10 g/l. Připraví se v čas potřeby.

Resorcinol R

Viz článek *Resorcinolum.*

Rhamnosa R

$C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$ M_r 182,2 CAS 6155-35-7

L-(+)-Rhamnosa; α-L-rhamnopyranosa monohydrát; 6-deoxy-L-mannosa

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě.

$[\alpha]_D^{20}$: +7,8° až 8,3°; měří se roztok (50 g/l) ve *vodě R* obsahující asi 0,05 % amoniaku (NH_3).

Rhaponticin R

$C_{21}H_{24}O_9$ M_r 420,4 CAS 155-58-8

3′,5-Dihydroxy-(4′-methoxy-3-stilbenyl)-β-D-glukopyranosid

Nažloutle šedý krystalický prášek, dobře rozpustný v lihu 96% a methanolu.

Chromatografie. Zkouší se postupem předepsaným v článku *Rhei radix.* Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Rhenistan draselný R

$KReO_4$ M_r 289,3 CAS 10466-65-6

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, v methanolu a v propylenglykolu.

Rhodamin B R

$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ M_r 479,0 CAS 81-88-9

Colour Index 45170, Schultz 864

[9-(2-Karboxyfenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden]diethylamoniumchlorid

Zelené krystaly nebo červenofialový prášek, velmi snadno rozpustné ve vodě a v lihu 96%.

Ricinový olej polyoxyethylenovaný R

Světle žlutá kapalina. Stává se čirou asi při 26 °C.

Rozpouštědlo hyaluronidasy R

100 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,4* se smíchá se 100 ml *vody R.* V tomto roztoku se rozpustí při 37 °C 0,140 g hydrolyzované *želatiny R.* Roztok je použitelný 2 h.

Rtuť R

Hg A_r 200,6 CAS 7439-97-6

Stříbrobílá kapalina, která při rozetření na papír tvoří kuličky nezanechávající kovovou stopu.
d_{20}^{20}: asi 13,5.
TV: asi 357 °C.

Rutin R

$C_{27}H_{30}O_{16} . 3H_2O$ M_r 665 CAS 153-18-4

Rutosid; 3-(O-6-deoxy-α-L-mannopyranosyl-(1→6)-β-D-glukopyranosyloxy)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)--5,7-dihydroxy-4*H*-chormen-4-on.

Žlutý krystalický prášek, na světle tmavnoucí, je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný asi ve 400 dílech vroucí vody, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru, dobře rozpustný v roztocích alkalických hydroxidů a v amoniaku.
TT: asi 210 °C, za rozkladu.

Roztok v *lihu 96% R* vykazuje absorpční maximum (*2.2.25*) při 259 nm a 362 nm.

Uchovává se chráněn před světlem.

Sabinen R

$C_{10}H_{16}$ M_r 136,2 CAS 3387-41-5

4-Methylen-1-(isopropyl)bicyklo[3,1,0]hexan; 4(10)-thujen

Bezbarvá olejovitá kapalina.
d_{25}^{25}: asi 0,843.
n_D^{20}: asi 1,468.
TV: 163 °C až 165 °C.

Při použití v plynové chromatografii vyhovuje následující zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) postupem uvedeným v článku *Auranti amari floris etheroleum* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku je nejméně 99,0 % celkové plochy píků.

Sacharosa R

Viz článek *Saccharosum*.

Při použití ke kontrole polarimetrů se použije látka uchovávaná v zatavené ampulce.

Salicylaldazin R

$C_{14}H_{12}N_2O_2$ M_r 240,3

2,2′-Azinodimethyldifenol

Příprava. Rozpustí se 0,30 g *hydraziniumsulfatu R* v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny octové ledové R* a 2 ml čerstvě připraveného roztoku *salicylaldehydu R* 20% (*V/V*) ve *2-propanolu R*. Smíchá se a nechá se ustát, dokud se nevytvoří žlutá sraženina. Směs se dvakrát vytřepává s 15 ml *dichlormethanu R*. Organické fáze se spojí a vysuší nad *síranem sodným bezvodým R*. Roztok se dekantuje nebo filtruje a odpaří se do sucha. Rekrystalizuje se ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (40 + 60) za chlazení. Krystalky se vysuší ve vakuu.
TT: asi 213 °C.

Chromatografie na tenké vrstvě. Zkouší se postupem předepsaným ve zkoušce pro hydrazin v článku *Povidonum*. Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Salicylaldehyd R

$C_7H_6O_2$ M_r 122,1 CAS 90-02-8

2-Hydroxybenzaldehyd

Čirá bezbarvá olejovitá kapalina.

d_{20}^{20}: asi 1,167.

n_D^{20}: asi 1,574.

TT: asi -7 °C.

TV: asi 196 °C.

Salicylan sodný R

Viz článek *Natrii salicylas*.

Salicylan železitý RS

0,10 g *síranu amonno-železitého R* se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 48 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 100 ml. K tomuto roztoku se přidá 50 ml roztoku *salicylanu sodného R* (11,5 g/l), 10 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 80 ml roztoku *octanu sodného R* (136 g/l) a zředí se *vodou R* na 500 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Selen R

Se A_r 79,0 CAS 7782-49-2

Hnědočervený až černý prášek nebo granule, je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustný v kyselině dusičné.

TT: asi 220 °C.

Serin R

Viz článek *Serinum*.

Silice citronová R

Viz článek *Citri etheroleum*.

Silikagel bezvodý R

CAS 112926-00-8

Je to částečně dehydratovaná amorfní polymerizovaná kyselina křemičitá. Má schopnost absorbovat při 20 °C vodu přibližně do 30 % své hmotnosti. Jako indikátor obsahuje chlorid kobaltnatý. Je prakticky nerozpustný ve vodě, částečně je rozpustný v roztoku hydroxidu sodného.

Silikagel G R

CAS 112926-00-8

Obsahuje asi 13 % síranu vápenatého ve formě hemihydrátu ($CaSO_4 . 0,5H_2O$). Bílý jemný homogenní prášek. Průměrná velikost částic je 15 μm.

Stanovení obsahu síranu vápenatého. 0,25 g se naváží do kuželové baňky se zabroušenou zátkou, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 100 ml *vody R*. Intenzivně se třepe 30 min,

potom se filtruje přes filtr ze slinutého skla, který se promyje. Filtrát a promývací voda se spojí a stanoví se vápník komplexometricky (*2.5.11*).

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,51 mg $CaSO_4 . 0,5H_2O$.

Hodnota pH (2.2.3). Asi 7,0; měří se suspenze připravená třepáním 1,0 g s 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po dobu 5 min.

Silikagel GF_{254} R

Obsahuje asi 13 % síranu vápenatého hemihydrátu a 1,5 % fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm. Bílý jemný homogenní prášek. Průměrná velikost částic je asi 15 μm.

Obsah síranu vápenatého. Stanoví se postupem uvedeným v odstavci *Silikagel G R*.

Hodnota pH (2.2.3). Stanoví se postupem uvedeným v odstavci *Silikagel G R*.

Zkouška fluorescence. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*). Na vrstvu *silikagelu GF_{254} R* se na 10 bodů startu nanese 1 μl, 2 μl až 10 μl roztoku *kyseliny benzoové R* (1,0 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *2-propanolu R* (10 + 90). Vyvíjí se po dráze 10 cm stejnou směsí. Po vytěkání rozpouštědel se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrny kyseliny benzoové se jeví jako tmavé skvrny na fluoreskujícím pozadí v horní třetině chromatogramu. Zřetelně viditelné jsou skvrny odpovídající roztokům obsahujícím 2 μg kyseliny benzoové a výše.

Silikagel aminopropylmethylsilanizovaný pro chromatografii R

Je to silikagel s jemnými částicemi (3 μm až 10 μm), na povrchu chemicky upravený navázáním aminopropylmethylsilanových skupin. Velikost částic je uvedena v závorce za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel aminopropylsilanizovaný pro chromatografii R

Silikagel s jemnými částicemi (3 μm až 10 μm), chemicky modifikovaný navázáním aminopropylsilanových skupin na povrchu. Velikost částic je uvedena za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Bílý jemný homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel butylsilanizovaný R

Je to velmi jemný silikagel (3 μm až 10 μm) na povrchu chemicky upravený navázáním butylsilanových skupin. Velikost částic je uvedena v závorce za názvem zkoumadla v příslušné zkoušce.

Bílý jemný homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Kuličky oxidu křemičitého. 30 nm.

Objem pórů. 0,6 cm^3/g.

Specifický povrch. 80 m^2/g.

Silikagel fenylovaný R

Je to velmi jemný silikagel (5 μm) chemicky modifikovaný na povrchu navázáním fenylových skupin. Velikost částic je uvedena za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Kuličky oxidu křemičitého. 8 nm.

Specifická plocha povrchu. 180 m^2/g.
Uhlíkové plnidlo. 5,5 %.

Silikagel HF$_{254}$ R

Obsahuje asi 1,5 % fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm. Bílý jemný homogenní prášek, průměrná velikost částic je 15 μm.

Hodnota pH (2.2.3). Stanoví se postupem uvedeným v odstavci *Silikagel G R.*

Fluorescence. Vyhovuje zkoušce předepsané v odstavci *Silikagel GF$_{254}$.*

Silikagel H R

Bílý jemný homogenní prášek, průměrná velikost částic je asi 15 μm.

Hodnota pH (2.2.3). Stanoví se postupem uvedeným v odstavci *Silikagel G R.*

Silikagel H silanizovaný R

Bílý jemný homogenní prášek, který po roztřepání s vodou plave na povrchu z důvodu svého hydrofobního charakteru.

Příprava vrstvy. Viz odstavec *Silikagel HF$_{254}$ silanizovaný R.*

Dělicí schopnost. Vyhovuje zkoušce předepsané v odstavci *Silikagel HF$_{254}$ silanizovaný R.*

Silikagel hexylsilanizovaný pro chromatografii R

Je to velmi jemný silikagel (3 µm až 10 µm) na povrchu chemicky upravený navázáním hexylsilanových skupin. Velikost částic je uvedena v závorce za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Bílý jemný homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel HF$_{254}$ silanizovaný R

Obsahuje asi 1,5 % fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Bílý jemný homogenní prášek, který po roztřepání s vodou plave na povrchu z důvodu svého hydrofobního charakteru.

Příprava tenké vrstvy. 30 g silikagelu silanizovaného HF$_{254}$ se intenzivně 2 min třepe se 60 ml směsi složené z objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (1 + 2). Nanese se na důkladně vyčištěné desky pomocí nanášecího zařízení, přičemž výška vrstvy je 0,25 mm. Suší se na vzduchu a potom 30 min v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Dělicí schopnost. Do kuželové baňky se zábrusem se naváží po 0,10 g *methyllauratu R*, *methylmyristatu R* a *methylstearatu R*. Přidá se 40 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a zahřívá se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se obsah baňky převede pomocí 100 ml *vody R* do dělicí nálevky, okyselí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* (pH 2 až 3) a směs se vytřepe třikrát s 10 ml *chloroformu R*. Chloroformové vrstvy se spojí, vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a odpaří do sucha na vodní lázni. Odparek se rozpustí v 50 ml *chloroformu R*. Z tohoto roztoku se nanese po 10 μl na tři body startu připravené vrstvy *silikagelu HF$_{254}$ R* a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové R*, *vody R* a *dioxanu R* (10 + 25 + 65) po dráze 14 cm (*2.2.27*). Vrstva se suší 30 min při 120 °C a po ochlazení se postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (35 g/l) v *2-propanolu R* a zahřívá se při 150 °C do objevení skvrn. Potom se vrstva ponechá v parách *amoniaku 17,5% RS* tak dlouho, až je pozadí bílé. Na chromatogramu jsou čtyři zřetelně oddělené, dobře definovatelné skvrny.

Silikagel hydrofilní pro chromatografii R

Je to velmi jemný silikagel s částicemi (3 μm až 10 μm), na povrchu upravený k získání hydrofilních vlastností. Velikost částic je uvedena v závorce za názvem zkoumadla v příslušné zkoušce.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel nitrilovaný pro chromatografii R

Je to velmi jemný silikagel, na povrchu chemicky upravený navázáním kyanopropylsilanových skupin. Velikost částic je uvedena v závorce za názvem zkoumadla v příslušné zkoušce.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

Silikagel nitrilovaný pro chromatografii R1

Jemný silikagel obsahující porézní kulovité částice s chemicky vázanými nitrilovými skupinami. Velikost částic je uvedena v závorce za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

Silikagel oktadecylsilanizovaný deaktivovaný pro chromatografii bazických látek R

Velmi jemný silikagel (3 μm až 10 μm), upravený před zavedením oktadecylsilanových skupin opatrným vymytím a hydrolýzou většiny povrchových siloxanových můstků minimalizujících interakci s bazickými složkami. Velikost částic je uvedena za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel oktadecylsilanizovaný pro chromatografii R

Velmi jemný silikagel (3 μm až 10 μm), na povrchu chemicky upravený navázáním oktadecylsilanových skupin. Velikost částic je uvedena v závorce za jménem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel oktylsilanizovaný pro chromatografii R

Velmi jemný silikagel (3 μm až 10 μm), na povrchu chemicky upravený navázáním oktylsilanových skupin. Velikost částic je uvedena v závorce za jménem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel pro chromatografii, aniontový měnič R

Velmi jemný silikagel (3 až 10 μm), na povrchu chemicky upravený zavedením kvarterních amoniových skupin. Velikost částic je uvedena za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Rozmezí hodnoty pH pro použití. 2 až 8.

Silikagel pro chromatografii R

Velmi jemný silikagel (3 μm až 10 μm). Velikost částic je uvedena za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Jemný bílý homogenní prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Silikagel pro vylučovací chromatografii R

Velmi jemný silikagel (10 μm) s velmi hydrofilním povrchem. Střední velikost pórů je 30 nm. Je kompatibilní s vodnými roztoky s hodnotou pH 2 až 8 a s organickými rozpouštědly. Je vhodný k dělení proteinů s relativní molekulovou hmotností $1 . 10^3$ až $3 . 10^5$.

Síra R

Viz článek *Sulfur ad usum externum.*

Síran amonno-železitý R

$FeNH_4(SO_4)_2 . 12H_2O$ M_r 482,2 CAS 7783-83-7

Síran amonno-železitý dodekahydrát

Světle fialové krystaly, zvětrávající, velmi snadno rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Síran amonno-železitý RS2

Roztok *síranu amonno-železitého R* (100 g/l). V případě potřeby se před použitím filtruje.

Síran amonno-železitý RS5

30,0 g *síranu amonno-železitého R* se třepe se 40 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 100 ml. Pokud je roztok zakalený, odstřeďuje se nebo filtruje.

Uchovává se chráněn před světlem.

Síran amonno-železitý RS6

20 g síranu *amonno-železitého R* se rozpustí v 75 ml *vody R*, přidá se 10 ml roztoku *kyseliny sírové R* 2,8% (*V/V*) a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Síran amonno-železnatý R

$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 . 6H_2O$ M_r 392,2 CAS 7783-85-9

Síran amonno-železnatý hexahydrát

Světle modrozelené krystaly nebo granule; je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Uchovává se chráněn před světlem.

Síran amonný R

$(NH_4)_2SO_4$ M_r 132,1 CAS 7783-20-2

Bezbarvé krystaly nebo bílá zrna. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,0; měří se roztok *ve vodě prosté oxidu uhličitého R* (50 g/l).

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,1 %.

Síran barnatý R

Viz článek *Barii sulfas.*

Síran ceričitý R

$Ce(SO_4)_2 . 4H_2O$ M_r 404,3 CAS 123333-60-8

Žlutý nebo oranžově žlutý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, pomalu se rozpouští ve zředěných kyselinách.

Síran draselno-chromitý R

$KCr(SO_4)_2 . 12H_2O$ M_r 499,4 CAS 7788-99-0

Síran draselno-chromitý dodekahydrát

Velké fialovočervené až černé krystalky, snadno rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Síran draselno-hlinitý R

Viz článek *Kalii aluminii sulfas*.

Síran draselný R

K_2SO_4 M_r 174,3 CAS 7778-80-5

Bezbarvé krystaly, dobře rozpustné ve vodě.

Síran hořečnatý R

Viz článek *Magnesii sulfas*.

Síran lithný R

$Li_2SO_4 . H_2O$ M_r 128,0 CAS 10102-25-7

Síran lithný monohydrát

Bezbarvé krystalky, snadno rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Síran manganatý R

$MnSO_4 . H_2O$ M_r 169,0 CAS 10034-96-5

Síran manganatý monohydrát

Slabě růžový krystalický prášek nebo krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Ztráta žíháním. 10,0 % až 12,0 %; stanoví se s 1,000 g při 500 °C.

Síran měďnatý R

$CuSO_4 . 5H_2O$ M_r 249,7 CAS 7758-99-8

Modrý prášek nebo tmavě modré krystalky, pomalu zvětrávající. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Síran měďnatý RS

Roztok 125 g/l.

Síran nikelnatý R

$NiSO_4 . 7H_2O$ M_r 280,9 CAS 10101-98-1

Heptahydrát síranu nikelnatého

Zelený krystalický prášek nebo zelené krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Síran rtuťnatý RS

CAS 7783-35-9

1,0 g *oxidu rtuťnatého R* se rozpustí ve směsi 4 ml *kyseliny sírové R* a 20 ml *vody R*.

Síran sodný bezvodý R

CAS 7757-82-6

Je to síran sodný vyžíhaný při 600 °C až 700 °C, který vyhovuje požadavkům článku *Natrii sulfas* a následující zkoušce:

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 130 °C.

Síran thalný R

Tl_2SO_4 M_r 504,8 CAS 7446-18-6

Bílé kosodélníkové krystaly, těžce rozpustné ve vodě a prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Síran vápenatý R

Bílý prášek, dobře rozpustný v asi 1500 dílech vody, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Smícháli se s vodou v hmotnostním poměru 2: 1, rychle tuhne na tvrdou a pórovitou hmotu.

Síran vápenatý RS

5,0 g *síranu vápenatého R* se třepe 1 h se 100 ml *vody R* a zfiltruje se.

Síran zinečnatý R

Viz článek *Zinci sulfas*.

Síran železitý R

$Fe_2(SO_4)_3 . nH_2O$ CAS 10028-22-5

Nažloutle bílý prášek, velmi hygroskopický, rozkládající se na vzduchu, těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech chráněn před světlem.

Síran železnatý R

Viz článek *Ferrosi sulfas*.

Síran železnatý RS2

0,45 g *síranu železnatého R* se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml.

Připraví se v čas potřeby.

Sirouhlík R

CS_2 M_r 76,1 CAS 76-15-0

Disulfid uhličitý

Bezbarvá nebo nažloutlá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,26.

TV: 46 °C až 47 °C.

Sirovodík R

H_2S M_r 34,08 CAS 7783-06-4

Sulfan

Plyn těžce rozpustný ve vodě.

Sirovodík RS

Čerstvě připravený roztok *sirovodíku R* ve *vodě R*. Roztok nasycený při 20 °C obsahuje asi 0,4 % až 0,5 % H_2S.

Siřičitan sodný bezvodý R

Viz článek *Natrii sulfis*.

Siřičitan sodný R

Viz článek *Natrii sulfis heptahydricus*.

Skopolaminiumbromid R

Viz článek *Scopolamini hydrobromidum*.

Směs formylační dle Béhala R

10,0 g *kyseliny mravenčí bezvodé R* se opatrně smíchá s 20,0 g *acetanhydridu R* při teplotě 0 °C; teplota směsi nepřesahuje 15 °C. Směs se pak během 15 min zahřeje na 50 °C a ihned se rychle ochladí. Roztok je bezbarvý.

Připravuje se v čas potřeby.

Směs redukční R

20 mg *bromidu draselného R*, 0,50 g *hydraziniumsulfatu R* a 5,0 g *chloridu sodného R* se rozetře a smíchá na homogenní směs.

Sodík R

Na A_r 22,99 CAS 7440-23-5

Kov, jehož povrch po čerstvém řezu se šedostříbrně leskne. Při přímém styku se vzduchem rychle oxiduje na hydroxid sodný a potom se mění na uhličitan sodný. Sodík reaguje prudce s vodou, přičemž se uvolňuje vodík a tvoří se roztok hydroxidu sodného. Sodík je dobře rozpustný v bezvodém methanolu za tvorby vodíku a roztoku methanolatu sodného; prakticky je nerozpustný v etheru a etheru petrolejovém.

Uchovává se pod etherem petrolejovým nebo tekutým parafinem.

Sodná sůl kyseliny glukuronové R

$C_6H_9NaO_7 . H_2O$ M_r 234,1 CAS 14984-34-0

Monohydrát sodné soli kyseliny D-glukuronové

$[\alpha]_D^{20}$: asi +21,5°, měří se roztok (20 g/l).

Sorbitol R

Viz článek *Sorbitolum*.

Squalan R

$C_{30}H_{62}$ M_r 422,8 CAS 111-01-3

2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetrakosan

Olejovitá bezbarvá kapalina, snadno rozpustná v etheru a mastných olejích, těžce rozpustná v acetonu, v lihu 96%, v ledové kyselině octové a methanolu.

d_{20}^{20}: 0,811 až 0,813.

n_D^{20}: 1,451 až 1,453.

Stabilizátor polymerů R1

$C_{50}H_{66}O_8$ M_r 795 CAS 32509-66-3

Ethylenbis[3,3-bis(3-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)butyrat]

Krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru petrolejovém, velmi snadno rozpustný v acetonu, v etheru a v methanolu.

TT: asi 165 °C.

Stabilizátor polymerů R2

$C_{54}H_{78}O_3$ M_r 775

4,4′,4″-[2,4,6-Trimethyl-1,3,5-benzentriyl-tris(methylen)]tris(2,6-di-terc.butylfenol)

Krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%.

TT: asi 244 °C.

Stabilizátor polymerů R3

$C_{73}H_{108}O_{12}$ M_r 1178 CAS 6683-19-8

Pentaerytrityl-tetrakis[3-(3,5-bis-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)propionat]

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v acetonu, v chloroformu, dobře rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v hexanu.

TT: 110 °C až 125 °C.

α-forma: 120 °C až 125 °C.

β-forma: 110 °C až 115 °C.

Stabilizátor polymerů R4

$C_{35}H_{62}O_3$ M_r 530,9 CAS 2082-79-3

Oktadecyl-[3-(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxyfenyl)propionat]

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v acetonu a hexanu, těžce rozpustný v methanolu.
TT: 49 °C až 55 °C.

Stabilizátor polymerů R5

$C_{48}H_{69}N_3O_6$ M_r 784,1 CAS 27676-62-6

1,3,5-Tris(3,5-di-terc.butyl-4-hydroxybenzyl)-1,3,5-triazin-2,4,6-1*H*,3*H*,5*H*-trion.
Bílý krystalický prášek.
TT: 218 °C až 222 °C.

Stabilizátor polymerů R6

$C_{41}H_{82}O_6P_2$ M_r 733

3,9-Bis(oktadecyloxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-difosfaspiro[5,5]undekan (dioxafosfan)
Bílá voskovitá látka, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v uhlovodících.
TT: 40 °C až 70 °C.

Stabilizátor polymerů R7

$C_{30}H_{58}O_4S$ M_r 514,8 CAS 123-28-4

Didodecyl-(3,3′-thiodipropionat)
Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a etheru petrolejovém, těžce rozpustný v lihu 96%.
TT: asi 39 °C.

Stabilizátor polymerů R8

$C_{42}H_{82}O_4S$ M_r 683 CAS 693-36-7

Dioktadecyl-(3,3′-thiodipropionat)
Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v acetonu, lihu 96% a etheru petrolejovém.
TT: 58 °C až 67 °C.

Stabilizátor polymerů R9

$C_{42}H_{63}O_3P$ M_r 647 CAS 31570-04-4

Tris(2,4-di-terc.butylfenyl)fosfit
Bílý prášek.
TT: asi 182 °C až 186 °C.

Streptomyciniumsulfat R

Viz článek *Streptomycini sulfas.*

Strychniniumnitrat R

$C_{21}H_{23}N_3O_5$ M_r 397,4 CAS 66-32-0

Bezbarvé jehličkovité krystaly nebo bílý mikrokrystalický prášek.
Je mírně rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v lihu 96%.

Chromatografie (2.2.27). Zkouší se postupem uvedeným v článku *Strychni semen*. Nanáší se 10 μl roztoku (1 mg/ml) v *lihu 96% R*. Na získaném chromatogramu je po postřiku v ultrafialovém světle při 254 nm jen jedna skvrna.

Styrendivinylbenzen-kopolymer R

Síťovaný polymer, porézní a tvrdý, ve formě kuliček. Vyrábějí se různé druhy s rozdílnou velikostí kuliček. Velikost kuliček se udává v závorce za názvem zkoumadla u příslušné zkoušky.

Sulfanilamid R

$C_6H_8N_2O_2S$ M_r 172,2 CAS 63-74-1

4-Aminobenzensulfonamid

Bílý prášek, těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, v acetonu, ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů, mírně rozpustný v lihu 96%, v etheru a etheru petrolejovém.

TT: asi 165 °C.

Sulfathiazol R

$C_9H_9N_3O_2S_2$ M_r 255,3 CAS 72-14-0

4-Amino-N-(2-thiazolyl)benzensulfonamid

Prášek nebo bílé nebo nažloutle bílé krystaly, velmi těžce rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v acetonu, těžce rozpustné v lihu 96%. Dobře se rozpouští ve zředěných roztocích minerálních kyselin, alkalických hydroxidů a uhličitanů.

TT: asi 200 °C.

Sulfid sodný R

$Na_2S \cdot 9H_2O$ M_r 240,2 CAS 1313-84-4

Bezbarvé, rychle žloutnoucí, roztékající se krystaly, velmi snadno rozpustné ve vodě.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Sulfid sodný RS

12 g *sulfidu sodného R* se rozpustí za zahřívání v 45 ml směsi objemových dílů *vody R* a *glycerolu 85% R* (10 + 29). Po ochlazení se stejnou směsí zředí na 100 ml. Roztok je bezbarvý.

Škrob rozpustný R

CAS 9005-84-9

Bílý prášek.

Roztok 20 g/l v horké *vodě R* nejvýše slabě opalizuje a po ochlazení zůstane tekutý.

Škrob RS

1,0 g *škrobu rozpustného R* se rozmíchá v 5 ml *vody R* a směs se za míchání vleje do 100 ml vroucí *vody R* obsahující 10 mg *jodidu rtuťnatého R*.

Před každým použitím se provede zkouška citlivosti.

Zkouška citlivosti. Směs 1 ml roztoku škrobu, 20 ml *vody R*, asi 50 mg *jodidu draselného R* a 0,05 ml *jodu RS1* je zbarvena modře.

Škrob s jodidem draselným RS

0,75 g *jodidu draselného R* se rozpustí ve 100 ml *vody R*. Zahřeje se k varu, za míchání se přidá 0,50 g *škrobu rozpustného R* v 35 ml *vody R*. Nechá se 2 min povařit a ochladí se.

Zkouška citlivosti. K 15 ml škrobového roztoku s jodidem draselným se přidá 0,05 ml *kyseliny octové ledové R* a 0,3 ml *jodu RS2*. Roztok zmodrá.

Škrob prostý jodidu RS

Roztok se připraví stejně jako v odstavci *Škrob RS* s tím rozdílem, že se nepřidá jodid rtuťnatý. Připravuje se v čas potřeby.

Šťavelan amonný R

$C_2H_8N_2O_4 \cdot H_2O$ M_r 142,1 CAS 6009-70-7

Bezbarvé krystalky, dobře rozpustné ve vodě.

Šťavelan amonný RS

Roztok 40 g/l.

Šťavelan sodný R

$C_2Na_2O_4$ M_r 134,0 CAS 62-76-0

Bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a etheru.

Tanin

CAS 1401-55-4

Amorfní prášek nebo lesklé lístky nažloutlé až světle hnědé barvy. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru.

Uchovává se chráněn před světlem.

Terc.amylalkohol R

$C_5H_{12}O$ M_r 88,1 CAS 75-85-4

Terc.pentylalkohol 2-methyl-2-butanol

Těkavá hořlavá kapalina. Je snadno rozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96%, s etherem a s glycerolem.

d_{20}^{20}: asi 0,81.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 100 °C až 104 °C.

Uchovává se chráněn před světlem.

Terc.butanol R

$C_4H_{10}O$ M_r 74,1 CAS 75-65-0

2-Methyl-2-propanol

Čirá bezbarvá kapalina nebo krystalická hmota. Je dobře rozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96% a s etherem.

Destilační rozmezí (2.2.11). Nejméně 95 % předestiluje při 81 °C až 83 °C.

Teplota tuhnutí (2.2.18). Asi 25 °C.

Terc.butylamin R

$C_4H_{11}N$ M_r 73,1 CAS 75-64-9

1,1-Dimethylethylamin; 2-amino-2-methylpropan

Kapalina mísitelná s lihem 96%.

d_{20}^{20}: asi 0,694.

n_D^{20}: asi 1,378.

TV: asi 46 °C.

Terc.butylmethylether R

$C_5H_{12}O$ M_r 88,1 CAS 1634-04-4

Bezbarvá čirá hořlavá kapalina.

n_D^{20}: asi 1,376.

Transmitance (2.2.25). Nejméně 50 % při 240 nm, nejméně 80 % při 255 nm, nejméně 98 % při 280 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

γ-Terpinen R

$C_{10}H_{16}$ M_r 136,2 CAS 99-85-4

1-Isopropyl-4-methyl-1,4-cyklohexadien

Bezbarvá čirá olejovitá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a etherem.

d_{20}^{20}: 0,848 až 0,849.

n_D^{20}: 1,474 až 1,475.

TV: 183 °C až 186 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* postupem uvedeným v odstavci *Karvon R* za použití zkoušené látky jako zkoušeného roztoku.

Plocha hlavního píku odpovídajícího γ-terpinenu je nejméně 93,0 % celkové plochy píků.

α-Terpineol R

$C_{10}H_{18}O$ M_r 154,2 CAS 98-55-5

(*RS*)-2-(4-Methyl-3-cyklohexenyl)-2-propanol

Může obsahovat 1 % až 3 % ß-terpineolu.

Bezbarvé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96% a v etheru.

d_{20}^{20}: asi 0,935.

n_D^{20}: asi 1,483.

$[\alpha]_D^{20}$: asi +92,5°.

TT: asi 35 °C.

Při použití pro plynovou chromatografii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za podmínek uvedených v článku *Anisi etheroleum.*

Zkoušený roztok. Roztok (100 g/l) v *hexanu R.*

Plocha hlavního píku je nejméně 97,0 % z celkové plochy píků. K píku odpovídajícímu hexanu se nepřihlíží.

Testosteronpropionat R

Viz článek *Testosteroni propionas*.

Tetraboritan sodný R

Viz článek *Natrii tetraboras*.

Tetraboritan sodný v kyselině sírové RS

9,55 g *tetraboritanu sodného R* se rozpustí zahřátím na vodní lázni v *kyselině sírové R* a zředí se stejnou kyselinou na 1000 ml.

Tetrabutylamoniumhydroxid R

$C_{16}H_{37}NO$ M_r 259,5 CAS 2052-49-5

Tetrabutylamoniumhydroxid (104 g/l) RS

Roztok obsahující 104 g/l $C_{16}H_{37}NO$ (M_r 259,5) se připraví rozpuštěním zkoumadla vhodné čistoty.

Tetrabutylamoniumhydroxid RS

Roztok obsahující 400 g/l $C_{16}H_{37}NO$ (M_r 259,5) vhodné čistoty.

Tetrabutylamoniumbromid R

$C_{16}H_{36}BrN$ M_r 322,4 CAS 1643-19-2

Bílé nebo téměř bílé krystaly.

TT: 102 °C až 104 °C.

Tetrabutylamoniumdihydrogenfosfat R

$C_{16}H_{38}NO_4P$ M_r 339,5 CAS 5574-97-0

Bílý prášek, hygroskopický.

Hodnota pH (*2.2.3*). Asi 7,5; měří se roztok (170 g/l).

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku (170 g/l) měřená při 210 nm je asi 0,10.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Tetrabutylamoniumhydrogensulfat R

$C_{16}H_{37}NO_4S$ M_r 339,5 CAS 32503-27-8

Bezbarvé krystaly nebo krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a methanolu.

TT: 169 °C až 173 °C.

Absorbance (*2.2.25.*). Absorbance roztoku (50,0 g/l) měřená mezi 240 nm a 300 nm je nejvýše 0,05.

Tetrabutylamoniumjodid R

$C_{16}H_{36}IN$ M_r 369,4 CAS 311-28-4

Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{16}H_{36}IN$. Bílý až mírně zbarvený krystalický prášek nebo krystaly. Je dobře rozpustný v lihu 96%.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,02 %.

Stanovení obsahu. 1,200 g se rozpustí ve 30 ml *vody R*, přidá se 50,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 5,0 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Nadbytek dusičnanu stříbrného se titruje *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,94 mg $C_{16}H_{36}IN$.

Tetrachlorethan R

$C_2H_2Cl_4$ M_r 167,9 CAS 79-34-5

1,1,2,2-Tetrachlorethan

Čirá bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,59.

n_D^{20}: asi 1,495.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejméně 95 % předestiluje při 145 °C až 147 °C.

Tetrachlormethan R

Viz *Chlorid uhličitý R.*

Tetradecylamoniumbromid R

$C_{40}H_{84}BrN$ M_r 659,0 CAS 14937-42-9

Bílý nebo slabě zbarvený krystalický prášek nebo krystaly.

TT: 88 °C až 89 °C.

Tetradekan R

$C_{14}H_{30}$ M_r 198,4 CAS 629-59-4

n-Tetradekan

Bezbarvá kapalina. Obsahuje nejméně 99,5 % $C_{14}H_{30}$.

d_{20}^{20}: asi 0,76.

n_D^{20}: asi 1,429.

TT: asi -5 °C.

TV: asi 252 °C.

Tetradeuterodimethylsilylvaleran sodný R

$C_6H_9{}^2H_4NaO_2Si$ M_r 172,3

Sodná sůl kyseliny (2,2,3,3-tetradeutero)-4,4 dimethyl-4-silylpentanové (TSP)

Stupeň deuterizace je nejméně 99 %. Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, v ethanolu a v methanolu.

TT: asi 300 °C.

Voda a deuteriumoxid. Nejvýše 0,5 %.

Tetraethylamoniumhydroxid RS

$C_8H_{21}NO$ M_r 147,3 CAS 77-98-5

Roztok 200 g/l. Bezbarvá kapalina, silně alkalická.

d_{20}^{20}: asi 1,01.
n_D^{20}: asi 1,372.
Jakost pro HPLC.

Tetraethylenpentamin R
$C_8H_{23}N_5$ M_r 189,3 CAS 112-57-2

3,6,9-Triaza-undekan-1,11-diamin
Bezbarvá kapalina, dobře rozpustná v acetonu.
n_D^{20}: asi 1,506.
Uchovává se chráněn před vlhkostí a teplem.

Tetrafenylboritan sodný R
$NaB(C_6H_5)_4$ M_r 342,2 CAS 143-66-8

Bílý až slabě žlutý objemný prášek, snadno rozpustný ve vodě a v acetonu.

Tetrafenylboritan sodný RS

Roztok 10 g/l. Je použitelný 1 týden, v případě potřeby se před použitím zfiltruje.

Tetraheptylamoniumbromid R
$C_{28}H_{60}BrN$ M_r 490,7 CAS 4368-51-8

Bílý nebo slabě zbarvený krystalický prášek nebo krystaly.
TT: 89 °C až 91 °C.

Tetrahydrofuran R
C_4H_8O M_r 72,1 CAS 109-99-9

Tetramethylenoxid
Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, mísitelná s vodou, s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,89.
Tetrahydrofuran, který nevyhovuje zkoušce na peroxidy, se nedestiluje.

Peroxidy. Do 12ml válce se zabroušenou zátkou o průměru asi 1,5 cm se převede 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS*. Doplní se zkoušeným tetrahydrofuranem po značku, silně se protřepe a nechá stát 30 min chráněn před světlem. Přitom nevznikne žádné zbarvení.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následujícímu dodatečnému požadavku:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 20 % při 255 nm, nejméně 80 % při 270 nm, nejméně 98 % při 310 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

Tetrajodortuťnatan draselný RS

1,35 g *chloridu rtuťnatého R* se rozpustí v 50 ml *vody R*. Přidá se 5,0 g *jodidu draselného R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Tetrajodortuťnatan draselný zásaditý RS

11 g *jodidu draselného R* a 15 g *jodidu rtuťnatého R* se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 100 ml. V čas potřeby se smíchají stejné objemové díly výsledného roztoku a roztoku *hydroxidu sodného R* (250 g/l).

Tetramethylamoniumchlorid R

$C_4H_{12}ClN$ M_r 109,6 CAS 75-57-0

Bezbarvé krystaly, dobře rozpustné ve vodě a v lihu 96%.
TT: asi 300 °C, za rozkladu.

Tetramethylamoniumhydroxid RS

$C_4H_{13}NO$ M_r 91,2 CAS 75-59-2

Obsahuje nejméně 10,0 % $C_4H_{13}NO$. Čirá bezbarvá nebo slabě žlutá kapalina, mísitelná s vodou a s lihem 96%.

Stanovení obsahu. K 1,000 g se přidá 50 ml *vody R* a titruje se *kyselinou sírovou 0,05 mol/l VS* za použití 0,1 ml *červeně methylové RS*.

1 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS* odpovídá 9,12 mg $C_4H_{13}NO$.

Tetramethylamoniumhydroxid zředěný RS

10 ml *tetramethylamoniumhydroxidu RS* se zředí *lihem 96% prostým aldehydů R* na 100 ml.
Připravuje se v čas potřeby.

Tetramethyldiaminodifenylmethan R

$C_{17}H_{22}N_2$ M_r 254,4 CAS 101-61-1

4,4′-Methylenbis(N,N-dimethylanilin)

Bílé až modravě bílé krystaly nebo plátky, prakticky nerozpustné ve vodě, těžce rozpustné v lihu 96%, dobře rozpustné v minerálních kyselinách, snadno rozpustné v etheru.
TT: asi 90 °C.

Tetramethylethylendiamin R

$C_6H_{16}N_2$ M_r 116,2 CAS 110-18-9

N,N,N′,N′-Tetramethylethylendiamin

Bezbarvá kapalina, mísitelná s vodou, s lihem 96% a s etherem.
d_{20}^{20}: asi 0,78.
n_D^{20}: asi 1,418.
TV: asi 121 °C.

Tetramethylsilan R

$C_4H_{12}Si$ M_r 88,2 CAS 75-76-3

TMS

Čirá bezbarvá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v acetonu a v lihu 96%.
d_{20}^{20}: asi 0,64.
n_D^{20}: asi 1,358.
TV: asi 26 °C.

Při použití pro nukleární magnetickou rezonanční spektrometrii vyhovuje následující doplňkové zkoušce: v nukleárním magnetickém rezonančním spektru roztoku (100 g/l) v *deuterizovaném chloroformu R* není intenzita cizího signálu větší než intenzita satelitních signálů C-13, které se objevují v odstupu 59,1 Hz po obou stranách hlavních signálů tetramethylsilanu. Výjimkou jsou signály rotačních postranních svazků a chloroformu.

Tetraoxalat draselný R

$C_4H_3KO_8 \cdot 2H_2O$ M_r 254,2 CAS 6100-20-5

Dihydrát trihydrogenbisšťavelanu draselného

Bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Tetrasulfatoceričitan amonný R

$(NH_4)_4Ce(SO_4)_4 \cdot 2H_2O$ M_r 633,0 CAS 18923-36-9

Oranžově žlutý krystalický prášek nebo krystaly. Pomalu se rozpouští ve vodě.

Thebain R

$C_{19}H_{21}NO_3$ M_r 311,4 CAS 115-37-7

(5*R*,9*R*,13*S*)-4,5-Epoxy-3,6-dimethoxy-9a-methylmorfin-6,8-dien

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v horkém lihu 96% a v toluenu, těžce rozpustný v etheru.

TT: asi 193 °C.

Chromatografie (*2.2.27*). Zkouší se postupem uvedeným ve zkoušce totožnosti B v článku *Opium crudum*. Na vrstvu se nanese 20 μl roztoku (0,5 g/l) do pruhu 3 mm x 20 mm. Na získaném chromatogramu se objeví oranžově červená nebo červená skvrna s R_F asi 0,5.

Theofylin R

Viz článek *Theophyllinum.*

Thiamazol R

$C_4H_6N_2S$ M_r 114,2 CAS 60-56-0

Methimazol; 1-methyl-1*H*-imidazol-2-thiol

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, mírně rozpustný v etheru.

TT: asi 145 °C.

Thioacetamid R

C_2H_5NS M_r 75,1 CAS 62-55-5

Bezbarvé krystalky nebo krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

TT: asi 113 °C.

Thioacetamid RS

Roztok 40 g/l.

Thioglykolan sodný R

$C_2H_3NaO_2S$ M_r 114,1 CAS 367-51-1

Merkaptooctan sodný

Bílý prášek, zrnka nebo krystalky. Je hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Thiokyanatan amonný R

NH_4SCN M_r 76,1 CAS 1762-95-4

Bezbarvé rozplývavé krystaly, velmi snadno rozpustné ve vodě, dobře rozpustné v lihu 96%. Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Thiokyanatan amonný RS

Roztok 76,0 g/l.

Thiokyanatan draselný R

KSCN M_r 97,2 CAS 333-20-0

Bezbarvé krystalky, rozplývavé, velmi snadno rozpustné ve vodě a v lihu 96%. Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Thiokyanatan draselný RS

Roztok 97,0 g/l.

Thiokyanatan rtuťnatý R

$Hg(SCN)_2$ M_r 316,7 CAS 592-85-8

Bílý krystalický prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustný v roztocích chloridu sodného.

Thiokyanatan rtuťnatý RS

0,30 g *thiokyanatanu rtuťnatého R* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100 ml. Roztok je použitelný jeden týden.

Thiokyanatan amonno-rtuťnatý RS

8,0 g *chloridu rtuťnatého R* a 9,0 g *thiokyanatanu amonného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Thiomersal R

$C_9H_9HgNaO_2S$ M_r 404,8 CAS 54-64-8

2-(Ethylmerkurithio)benzoan sodný

Lehký nažloutlý krystalický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Thiomočovina R

CH_4N_2S M_r 76,1 CAS 62-56-6

Bílý krystalický prášek nebo krystalky. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.
TT: asi 178 °C.

Thiosíran sodný R

Viz článek *Natrii thiosulfas*.

Threonin R

Viz článek *Threoninum*.

Thymin R

$C_5H_6N_2O_2$ M_r 126,1 CAS 65-71-4

5-Methylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion

Krátké jehličky nebo destičky, těžce rozpustné ve studené vodě, dobře rozpustné v horké vodě. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Thymolftalein R

$C_{28}H_{30}O_4$ M_r 430,5 CAS 125-20-2

2,2-Dimethyl-5,5′-diisopropylfenolftalein

Bílý až nažloutlý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných alkalických roztocích.

Thymolftalein RS

Roztok 1,0 g/l v *lihu 96% R.*

Zkouška citlivosti. K 0,2 ml se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R;* roztok zůstane bezbarvý. Ke změně zbarvení na modré se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Barevný přechod. pH 9,3 (bezbarvý) až pH 10,5 (modrý).

Thymol R

Viz článek *Thymolum*.

Titan R

Ti A_r 47,88 CAS 7440-32-6

Obsahuje nejméně 99 % Ti. Kovový prášek nebo jemný drátek (průměr nejvýše 0,5 mm).

o-Tolidin R

$C_{14}H_{16}N_2$ M_r 212,29 CAS 119-93-97

3,3′-Dimethylbenzidin

Světle nahnědlý krystalický prášek pachu po anilinu. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných kyselinách.

TT: 129 °C až 131 °C.

Rozpustnost. 0,10 g se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a přidá se 20 ml *vody R;* vzniklý roztok je čirý.

o-Tolidin RS

0,10 g *o-tolidinu R* se rozetře v porcelánové misce s 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 10% RS* a přidá se 100 ml až 200 ml *vody R.* Po rozpuštění se roztok převede pomocí *vody R* do odměrné baňky na 1000 ml, doplní se *vodou R* po značku a promíchá se.

Toluen R

C_7H_8 M_r 92,1 CAS 108-88-3

Methylbenzen

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%.

d_{20}^{20}: 0,865 až 0,870.

TV: asi 110 °C.

Toluen prostý síry R

Vyhovuje požadavkům uvedeným pro *Toluen R* a následujícím zkouškám:

Sirné sloučeniny. 10 ml se zahřívá k varu 15 min pod zpětným chladičem s 1 ml *ethanolu R* a s 3 ml *olovnatanu draselného RS.* Po 5min stání se vodná vrstva nezbarví tmavěji.

Sloučeniny odvozené od thiofenu. 2 ml se 5 min třepou s 5 ml *zkoumadla isatinového R.* Po 15min stání se spodní vrstva nezbarví do modra.

o-Toluensulfonamid R

$C_7H_9NO_2S$ M_r 171,2 CAS 88-19-7

2-Methylbenzensulfonamid

Bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě a v etheru, dobře rozpustný v lihu 96% a roztocích alkalických hydroxidů.

TT: asi 156 °C.

p-Toluensulfonamid R

$C_7H_9NO_2S$ M_r 171,2 CAS 70-55-3

4-Methylbenzensulfonamid

Bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě a v etheru, dobře rozpustný v lihu 96% a v roztocích alkalických hydroxidů.

TT: asi 136 °C.

Chromatografie. Zkouší se za stejných podmínek a ve stejné koncentraci předepsané v článku *Tolbutamidum.* Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

o-Toluidin R

C_7H_9N M_r 107,2 CAS 95-53-4

2-Methylanilin

Slabě žlutě zbarvená kapalina, která se vlivem vzduchu a světla barví červenohnědě. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných kyselinách.

d_{20}^{20}: asi 1,01.

n_D^{20}: asi 1,569.

TV: asi 200 °C.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

o-Toluidin RS

0,1 g *o-toluidinu R* se rozetře v porcelánové misce s 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 10% RS* a přidá se 100 ml až 200 ml *vody R.* Po rozpuštění se roztok převede pomocí *vody R* do 1000ml odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

p-Toluidin R

C_7H_9N M_r 107,2 CAS 106-49-0

4-Methylanilin

Lesklé destičky nebo vločky. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru.

TT: asi 44 °C.

Tosylargininiummethylesterchlorid R

$C_{14}H_{23}ClN_4O_4S$ M_r 378,9 CAS 1784-03-8

L-1-[4-(methoxykarbonyl)-4-(tosylamido)butyl]guanidiniumchlorid

$[\alpha]_D^{20}$: -12° až -16°; měří se roztok (40 g/l).

TT: asi 145 °C.

Tosylargininiummethylesterchlorid RS

98,5 mg *tosylargininiummethylesterchloridu R* se třepe s 5 ml *tlumivého roztoku trometamolového o pH 8,1* do rozpuštění. Po přidání 2,5 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* se zředí *vodou R* na 25,0 ml.

Tosylfenylalanylchlormethan R

$C_{17}H_{18}ClNO_3S$ M_r 351,9 CAS 402-71-1

(*S*)-1-chlor-4-fenyl-3-(tosylamido)-2-butanon

$[\alpha]_D^{20}$: -85° až -89°; měří se roztok (10 g/l) v *lihu 96% R*.

$A_{1cm}^{1\%}$: 290 až 320; měří se roztok v *lihu 96% R* při 228,5 nm.

TT: asi 105 °C.

Tosyllysylchlormethanhydrochlorid R

$C_{14}H_{22}Cl_2N_2O_3S$ M_r 369,3 CAS 4238-41-9

(3*S*)-[7-chlor-5-(tosylamido)-6-oxoheptyl]amoniumchlorid

$[\alpha]_D^{20}$: -7° až -9°; měří se roztok (20 g/l).

$A_{1cm}^{1\%}$: 310 až 340; měří se při 230 nm ve *vodě R*.

TT: asi 155 °C, za rozkladu.

Tragant R

Viz článek *Tragacantha*.

Triacetin R

$C_9H_{14}O_6$ M_r 218,2 CAS 102-76-1

Glyceroltriacetat

Bezbarvá až nažloutlá, téměř čirá kapalina, dobře rozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,16.

n_D^{20}: asi 1,43.

TV: asi 260 °C.

1,1,1-Trichlorethan R

$C_2H_3Cl_3$ M_r 133,4 CAS 71-55-6

Methylchloroform

Nehořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v acetonu, v etheru a v methanolu.

d_{20}^{20}: asi 1,34.

n_D^{20}: asi 1,438.

TV: asi 74 °C.

Trichlorethylen R

C_2HCl_3 M_r 131,4 CAS 79-01-6

Bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,46.

n_D^{20}: asi 1,477.

Trichlortrifluorethan R

$C_2Cl_3F_3$ M_r 187,4 CAS 76-13-1

1,1,2-Trifluor-1,2,2-trichlorethan

Bezbarvá prchavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s acetonem a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 1,58.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejméně 98 % předestiluje při 47 °C až 48 °C.

Triethanolamin R

$C_6H_{15}NO_3$ M_r 149,2 CAS 102-71-6

2,2′,2″-Nitrilotriethanol

Bezbarvá viskózní velmi hygroskopická kapalina, která působením vzduchu a světla hnědne. Je mísitelný s vodou, s acetonem, s lihem 96%, s glycerolem 85% a s methanolem.

d_{20}^{20}: asi 1,13.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Triethylamin R

$C_6H_{15}N$ M_r 101,2 CAS 121-44-8

N,N-Diethylethanamin

Bezbarvá kapalina, těžce rozpustná ve vodě při teplotě pod 18,7 °C, mísitelná s lihem 96% a etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,727.

n_D^{20}: asi 1,401.

TV: asi 90 °C.

Triethylendiamin R

$C_6H_{12}N_2$ M_r 112,2

1,4-Diazabicyklo[2,2,2]oktan

Velmi hygroskopické krystaly, které při laboratorní teplotě snadno sublimují, snadno se rozpouštějí ve vodě, v acetonu a v ethanolu.

TT: asi 158 °C.
TV: asi 174 °C.
Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Trifenylmethanol R
$C_{19}H_{16}O$ M_r 260,3 CAS 76-84-6

Trifenylkarbinol
Bezbarvé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%.

Trifenyltetrazoliumchlorid R
$C_{19}H_{15}ClN_4$ M_r 334,8 CAS 298-96-4

2,3,5-Trifenyl-2*H*-tetrazoliumchlorid
Obsahuje nejméně 98,0 % $C_{19}H_{15}ClN_4$.
Slabě nebo tmavě žlutý prášek, dobře rozpustný ve vodě, v acetonu a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.
TT: asi 240 °C, za rozkladu.
Stanovení obsahu. 1,000 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 45 ml *vody R*. Přidá se 50,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se přidají 3 ml *dibutylftalatu R*. Po silném protřepání a po přidání 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru se titruje *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS*.
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,48 mg $C_{19}H_{15}ClN_4$.
Uchovává se chráněn před světlem.

Trifenyltetrazoliumchlorid RS

Roztok 5,0 g/l v *lihu 96% prostém aldehydů R*.
Uchovává se chráněn před světlem.

Trifluoracetanhydrid R

$C_4F_6O_3$ M_r 210,0 CAS 407-25-0

Bezbarvá kapalina.
d_{20}^{20}: asi 1,5.

Trikosan R
$C_{23}H_{48}$ M_r 324,6 CAS 638-67-5

Bílé krystaly, prakticky nerozpustné ve vodě, rozpustné v etheru a v hexanu.
n_D^{20}: asi 1,447.
TT: asi 48 °C.

Trimethylpentan R
C_8H_{18} M_r 114,2 CAS 540-84-1

2,2,4-Trimethylpentan
Bezbarvá zápalná kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v ethanolu.
d_{20}^{20}: 0,691 až 0,696.
n_D^{20}: 1,391 až 1,393.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejméně 95 % předestiluje při 98 °C až 100 °C.

Při použití pro spektrofotometrii vyhovuje následující dodatečné zkoušce:

Transmitance (2.2.25). Nejméně 98 % při 250 nm až 420 nm; měří se proti *vodě R* jako kontrolní tekutině.

N-Trimethylsilylimidazol R

$C_6H_{12}N_2Si$ M_r 140,3 CAS 18156-74-6

Bezbarvá hygroskopická kapalina.

d_{20}^{20}: asi 0,96.

n_D^{20}: asi 1,48.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Trinitrofenolat sodný RS

10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (50 g/l) se smíchá s 20 ml *trinitrofenolu RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml. Je použitelný 2 dny.

Trinitrofenol R

$C_6H_3N_3O_7$ M_r 229,1 CAS 88-89-1

2,4,6-Trinitrofenol; kyselina pikrová

Hranolky nebo krystaly žluté barvy. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Uchovává se zvlhčený *vodou R*.

Trinitrofenol RS

Roztok 10 g/l.

Trinitrofenol RS1

100 ml nasyceného roztoku *trinitrofenolu R* se smíchá s 0,25 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

Triskyanoethoxypropan R

$C_{12}H_7N_3O_3$ M_r 251,3

1,2,3-Tris(2-kyanoethoxy)propan

Viskózní hnědožlutá kapalina, dobře rozpustná v methanolu. Používá se jako stacionární fáze v plynové chromatografii.

d_{20}^{20}: asi 1,11.

Viskozita (*2.2.9*). Asi 172 mPa.s.

Trombin hovězí R

CAS 9002-04-4

Enzymatický přípravek získaný z hovězí plazmy, který mění fibrinogen na fibrin. Žlutavě bílý prášek.

Uchovává se při teplotě pod 0 °C.

Trombin lidský R

CAS 9002-04-4

Vysušený lidský trombin je enzymový přípravek, který mění lidský fibrinogen na fibrin. Získává se z tekuté lidské plazmy srážením vhodnými solemi a organickými rozpouštědly za kontroly pH, koncentrace iontů a teploty.

Žlutobílý prášek, snadno rozpustný v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) za tvorby zakaleného světle žlutého roztoku. Uchovává se v zatavených sterilních obalech v atmosféře dusíku, chráněn před světlem a při teplotě pod 25 °C.

Trombin lidský RS

Trombin lidský R se rozpustí podle návodu výrobce a zředí se *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,4* na koncentraci 5 m.j. v mililitru.

Trometamol R

Viz článek *Trometamolum.*

Trometamol RS

Množství *trometamolu R* odpovídající 24,22 g $C_4H_{11}NO_3$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Trometamol RS1

60,6 mg *trometamolu R* a 0,234 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Trypsin R

CAS 9002-07-7

Proteolytický enzym získaný aktivací trypsinogenu extrahovaného z hovězího pankreatu (*Bos taurus* L.). Bílý krystalický nebo amorfní prášek, mírně rozpustný ve vodě.

Trypsin pro peptidové mapování R

CAS 9002-07-7

Trypsin vysoké čistoty, upravený tak, aby byl zbaven chymotrypsinové účinnosti.

Tryptofan R

$C_{11}H_{12}N_2O_2$ M_r 204,2 CAS 73-22-3

Bílý nebo žlutobílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

$[\alpha]_D^{20}$: asi -30°, stanoví se s roztokem 10 g/l.

Tyrosin R

$C_9H_{11}NO_3$ M_r 181,2 CAS 60-18-4

Kyselina 2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)propionová

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé až bílé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu, v ethanolu a v etheru, dobře rozpustný ve zředěné kyselině chlorovodíkové a v roztocích alkalických hydroxidů.

Chromatografie. Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Levodopum*. Na získaném chromatogramu je jen jedna hlavní skvrna.

Uhlí pro chromatografii grafitizované R

Obsahuje uhlíkové řetězce s délkou větší než C_9 o velikosti částic 400 μm až 850 μm.

Hustota. 0,72.

Plocha povrchu. 10 m^2/g.

Nepoužívá se při teplotě vyšší než 400 °C.

Uhličitan amonný R

CAS 506-87-6

Je to směs proměnného množství hydrogenuhličitanu amonného (NH_4HCO_3; M_r 79,1) a amoniumkarbamatu ($H_2NCOONH_4$; M_r 78,1).

Obsahuje nejméně 30 % NH_3; M_r 17,03. Bílá průsvitná hmota, pomalu rozpustná v asi 4 dílech vody. Látka se rozkládá vařením ve vodě.

Stanovení obsahu. 2,00 g se rozpustí ve 25 ml *vody R* a pomalu se přidá 50,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a 0,1 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS.*

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 17,03 mg NH_3.

Uchovává se při teplotě nižší než 20 °C.

Uhličitan amonný RS

Roztok 158 g/l.

Uhličitan barnatý R

$BaCO_3$ M_r 197,3 CAS 513-77-9

Bílý prášek nebo bílá drobivá hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě.

Uhličitan draselný R

K_2CO_3 M_r 138,2 CAS 584-08-7

Bílý zrnitý prášek, hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Uhličitan lithný R

Li_2CO_3 M_r 73,9 CAS 554-13-2

Bílý lehký prášek, mírně rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%. Nasycený roztok při 20 °C obsahuje 13 g/l Li_2CO_3.

Uhličitan sodný bezvodý R

Na_2CO_3 M_r 106,0 CAS 497-19-8

Bílý hygroskopický prášek, snadno rozpustný ve vodě. Při zahřátí asi na teplotu 300 °C je úbytek hmotnosti nejvýše 1 %. Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Uhličitan sodný R

Viz článek *Natrii carbonas decahydricus*.

Uhličitan sodný RS

Roztok *uhličitanu sodného bezvodého R* 106 g/l.

Uhličitan sodný RS1

Roztok *uhličitanu sodného bezvodého R* (20 g/l) v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS*.

Uhličitan vápenatý R

Viz článek *Calcii carbonas*.

Uhlovodíky s nízkým tlakem par (typ L) R

Mazlavá hmota, dobře rozpustná v benzenu a toluenu.

Undekan R

$C_{11}H_{24}$ M_r 156,3 CAS 1120-21-4

Bezbarvá čirá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem a etherem.
d_{20}^{20}: 0,740 až 0,742.
n_D^{20}: asi 1,4172.
TV: asi 195 °C.

Uridin R

$C_9H_{12}N_2O_6$ M_r 244,2 CAS 58-96-8

1-ß-D-Ribofuranosyluracil
Bílý nebo většinou bílý krystalický prášek, dobře rozpustný ve vodě.
TT: asi 165 °C.

Vanadičnan amonný R

NH_4VO_3 M_r 117,0 CAS 7803-55-6

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v *amoniaku zředěném RS1*.

Vanilin R

Viz článek *Vanillinum.*

Vaselina bílá R

Viz *Parafin bílý měkký R.*

Vata s octanem olovnatým R

Hydrofilní vata se ponoří do směsi 1 objemového dílu *kyseliny octové zředěné RS* a 10 objemových dílů *octanu olovnatého RS*. Přebytečný roztok se odstraní vložením vaty bez zatížení mezi více vrstev filtračního papíru a nechá se na vzduchu vysušit.

Uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Vínan draselno-antimonitý R

$C_4H_4KO_7Sb \cdot 0{,}5H_2O$ M_r 333,9

Aquatartratoantimonitan draselný hemihydrát

Bílý granulovaný prášek nebo bezbarvé průsvitné krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě a v glycerolu, snadno rozpustný ve vroucí vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Vodný roztok reaguje slabě kysele.

Vínan draselno-sodný R

$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ M_r 282,2 CAS 6381-59-5

Prizmatické bezbarvé krystaly, velmi snadno rozpustné ve vodě.

Vínan draselný R

$C_4H_4K_2O_6 \cdot 0{,}5H_2O$ M_r 235,3 CAS 921-53-9

Hemihydrát draselné soli (2*R*,3*R*)-2,3-butandiové kyseliny

Granulovaný prášek nebo bílé krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Vínan měďnatý RS

Roztok I. 34,6 g *síranu měďnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí do 500 ml.
Roztok II. 173 g *vínanu draselno-sodného R* a 50 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve 400 ml *vody R*. Zahřeje se k varu, nechá se zchladnout a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 500 ml.

Stejné objemy obou roztoků se smíchají v čas potřeby.

Vínan měďnatý RS2

1 ml roztoku *síranu měďnatého R* (5 g/l) a roztoku *vínanu draselného R* (10 g/l) se smíchají s 50 ml *uhličitanu sodného RS1*.

Připravuje se v čas potřeby.

Vínan měďnatý RS3

Smíchají se stejné objemové díly roztoku *síranu měďnatého R* (10 g/l) a *vínanu sodného R* (20 g/l). K 1,0 ml směsi se přidá 50,0 ml *uhličitanu sodného RS1*. Roztok se připravuje v čas potřeby.

Vínan měďnatý RS4

Roztok I. *Síran měďnatý R* 150 g/l.
Roztok II. 2,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, *2,5* g *vínanu draselno-sodného R*, 2,0 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a 20,0 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Těsně před použitím se smíchá 1 díl roztoku I s 25 díly roztoku II.

Vínan sodný R

$C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$ M_r 230,1 CAS 6106-24-7

Dihydrát disodné soli kyseliny (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxybutandiové

Bílé krystaly nebo granule, velmi snadno rozpustné ve vodě, prakticky nerozpustné v lihu 96%.

Vinylchlorid R

C_2H_3Cl M_r 62,5 CAS 75-01-4

Bezbarvý plyn, těžce rozpustný v organických rozpouštědlech.

2-Vinylpyridin R

C_7H_7H M_r 105,1 CAS 100-69-6

Žlutá kapalina, mísitelná s vodou.
d_{20}^{20}: asi 0,97.
n_D^{20}: asi 1,549.

Violeť krystalová R

$C_{25}H_{30}ClN_3$ M_r 408,0 CAS 548-62-9

Colour Index 42555, Schultz 78
Hexamethyl-*p*-rosaniliniumchlorid

Tmavozelený prášek nebo krystaly. Je dobře rozpustná ve vodě a v lihu 96%.

Violeť krystalová RS

0,50 g *violeti krystalové R* se rozpustí v *kyselině octové bezvodé R* a zředí se jí na 100 ml.

Zkouška citlivosti. K 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* se přidá 0,1 ml roztoku krystalové violeti; roztok je fialový. Přidáním nejvýše 0,1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* se změní zbarvení na modrozelené.

Voda R

Viz článek *Aqua purificata*.

Voda destilovaná R

Voda R připravená destilací.

Voda na injekci R

Viz článek *Aqua pro iniectione*.

Voda pro chromatografii R

CAS 7732-18-5

Deionizovaná *voda R* s měrným odporem menším než 0,18 MΩ.m.

Voda prostá dusičnanů R

Ke 100 ml *vody R* se přidá několik miligramů *manganistanu draselného R* a *hydroxidu barnatého R*. Destiluje se za použití přístroje pro stanovení destilačního rozmezí (*2.2.11*). Prvních 10 ml se odstraní a dalších 50 ml se použije.

Voda prostá amoniaku R

Ke 100 ml *vody R* se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové R*. Destiluje se za použití přístroje pro stanovení destilačního rozmezí (*2.2.11*). Prvních 10 ml se odstraní a dalších 50 ml se použije.

Voda prostá oxidu uhličitého R

Je to *voda R* několik minut vařená a při chlazení a uchovávání chráněná před vzduchem.

Voda prostá částic R

Voda R se filtruje přes membránu s velikostí pórů 0,22 µm.

Vodík pro chromatografii R

H_2 M_r 2,016 CAS 1333-74-0

Obsahuje nejméně 99,95 % (*V/V*) H_2.

Wolframan sodný R

$Na_2WO_4 . 2H_2O$ M_r 329,9 CAS 10213-10-2

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě na čirý roztok a prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Xanthydrol R

$C_{13}H_{10}O_2$ M_r 198,2 CAS 90-46-0

9-Xanthenol

Obsahuje nejméně 90,0 % $C_{13}H_{10}O_2$. Dodává se také ve formě methanolického roztoku obsahujícího 90 g/l až 110 g/l xanthydrolu. Bílý nebo slabě nažloutlý prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, v etheru a v ledové kyselině octové.

TT: asi 123 °C.

Stanovení obsahu. V baňce na 250 ml se rozpustí 0,300 g xanthydrolu ve 3 ml *methanolu R* nebo se použijí 3,0 ml methanolického roztoku. Přidá se 50 ml *kyseliny octové ledové R* a po kapkách za současného míchání 25 ml roztoku *močoviny R* (20 g/l). Nechá se 12 h stát, sraženina se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16), promyje se 20 ml *lihu 96% R*, vysuší se při 100 °C až 105 °C a zváží se.

1 g sraženiny odpovídá 0,9429 g xanthydrolu.

Uchovává se chráněný před světlem. Methanolický roztok se uchovává v zatavených ampulkách. V případě potřeby se před použitím zfiltruje.

Xanthydrol R1

Vyhovuje požadavkům uvedeným v odstavci *Xanthydrol R* a následujícímu dodatečnému požadavku: *xanthydrol R1* obsahuje nejméně 98,0 % $C_{13}H_{10}O_2$.

Xanthydrol RS

K 0,1 ml roztoku *xanthydrolu R* (100 g/l) v *methanolu R* se přidá 100 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Roztok se připravuje 24 h před použitím.

o-Xylen R

C_8H_{10} M_r 106,2 CAS 95-47-6

1,2-Dimethylbenzen

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,881.

n_D^{20}: asi 1,505.

TV: asi 144 °C.

TT: asi -25 °C.

Xylen R

C_8H_{10} M_r 106,2 CAS 1330-20-7

Dimethylbenzen, směs izomerů

Čirá bezbarvá hořlavá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96% a s etherem.

d_{20}^{20}: asi 0,867.

n_D^{20}: asi 1,497.

TV: asi 138 °C.

Xylosa R

$C_5H_{10}O_5$ M_r 150,1 CAS 58-86-6

D-(+)-Xylosa; β-D-xylopyranosa

Krystalický bílý prášek nebo bezbarvé jehličky. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná za tepla v lihu 96%.

$[\alpha]_D^{20}$: asi +20°, měří se roztok (100 g/l) 10 h po jeho přípravě.

Zeleň bromkresolová R

$C_{21}H_{14}Br_4O_5S$ M_r 698 CAS 76-60-8

4,4′-(3*H*-2,1-Benzoxathiol-3-yliden)bis(2,6-dibrom-3-methylfenol)-5,5′-dioxid

Hnědavě bílý prášek, těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zeleň bromkresolová RS

50 mg *zeleně bromkresolové R* se rozpustí v 0,72 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 20 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkouška citlivosti. Směs 0,2 ml roztoku bromkresolové zeleně a 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* je modrá. Ke změně zbarvení na žluté se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS.*

Barevný přechod. pH 3,6 až 5,2 ze žluté do modré.

Zeleň malachitová R

$C_{23}H_{25}ClN_2$ M_r 364,9 CAS 123333-61-9

Colour Index 42000, Schultz 754

{4-[(4-Dimethylaminofenyl)fenyl-methylen]cyklohexa-2,5-dien-1-yliden}dimethylamoniumchlorid

Zelené krystaly s kovovým leskem, velmi dobře rozpustné ve vodě na roztok modrozelené barvy, dobře rozpustné v lihu 96% a v methanolu.

Roztok 0,01 g/l v *lihu 96% R* vykazuje absorpční maximum (*2.2.25*) při 617 nm.

Zeleň malachitová RS

Roztok (5,0 g/l) v *kyselině octové bezvodé R.*

Zeleň methylová R

$C_{26}H_{33}Cl_2N_3$ M_r 458,5 CAS 7114-03-6

Colour Index 42585, Schultz 788

4-{[4-(Dimethylamino)fenyl][4-(dimethyliminio)cyklohexa-2,5-dienyliden]methylfenyl}trimethylamoniumdichlorid

Zelený prášek, dobře rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v kyselině sírové na žlutě zbarvený roztok, jehož zbarvení se po zředění vodou mění na zelené.

Zinek aktivovaný R

Aktivace. Do kuželové baňky se převede malé množství zinku ve formě kuliček nebo válečků, přidá se takové množství roztoku obsahujícího 50 μg/ml *kyseliny chloroplatičité R*, aby pokrylo zinek. Nechá se působit 10 min, kov se opláchne a ihned vysuší.

Arsen. K 5,0 g se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 25 ml *vody R*, 0,1 ml *chloridu cínatého RS* a 5 ml *jodidu draselného RS.* Dále se postupuje podle stati (*2.4.2)* Arsen, způsob A. Na *papíru s bromidem rtuťnatým R* nevznikne žádná skvrna.

Citlivost. Provede se limitní zkouška na As za použití stejných zkoumadel a za přidání roztoku obsahujícího 1 μg arsenu. Na *papíru s bromidem rtuťnatým R* vznikne zřetelně viditelná skvrna.

Zinek práškový R

Obsahuje nejméně 90,0 % Zn (A_r 65,4). Šedý velmi jemný prášek, dobře rozpustný v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS.*

Zinek R

Zn A_r 65,4 CAS 7440-66-6

Obsahuje 99,5 % Zn. Stříbrobílé válečky, granule, kuličky nebo částice s modrým leskem.

Arsen (2.4.2). 5,0 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (0,2 μg/g). Rozpustí se v předepsané směsi 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 25 ml *vody R.*

Zkoumadlo aminohippurové R

3,0 g *kyseliny ftalové R* a 0,30 g *kyseliny aminohippurové R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Zkoumadlo aminomethylalizarindioctové R

Roztok I. 0,36 g *dusičnanu ceritého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Roztok II. 0,70 g *kyseliny aminomethylalizarindioctové R* se suspenduje v 50 ml *vody R*. Látka se přidáním asi 0,25 ml *amoniaku 26% R* rozpustí a roztok se po přidání 0,25 ml *kyseliny octové ledové R* zředí *vodou R* na 100 ml.
Roztok III. 6,0 g *octanu sodného R* se rozpustí v 50 ml *vody R*. Přidá se 11,5 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

K 33 ml *acetonu R* se přidá 6,8 ml roztoku III, 1,0 ml roztoku II a 1,0 ml roztoku I. Směs se zředí *vodou R* na 50 ml.

Zkouška citlivosti. K 1,0 ml základního *roztoku fluoridu (10 μg F/ml)* se přidá 19,0 ml *vody R* a 5,0 ml aminomethylalizarindioctového zkoumadla. Po 20 min směs vykazuje zřetelně modré zbarvení.

Toto zkoumadlo je použitelné nejvýše 5 dnů.

Zkoumadlo biuretové R

1,5 g *síranu měďnatého R* a 6,0 g *vínanu draselno-sodného R* se rozpustí v 500 ml *vody R*. Přidá se 300 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l) prostého uhličitanů a zředí se jím na 1000 ml a promíchá se.

Zkoumadlo cefalinové R

K 0,5 g až 1,0 g *hovězího mozku sušeného R* se přidá 20 ml *acetonu R*, nechá se 2 h stát, potom se 2 min odstřeďuje při 500 g_n a supernatantní tekutina se dekantuje. Zbytek se vysuší ve vakuu, přidá se 20 ml *chloroformu R* a za častého protřepání se nechá 2 h stát. Pevný podíl se oddělí filtrací nebo odstřeďováním, chloroform se ve vakuu odpaří a zbytek se suspenduje v 5 ml až 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

Rozpouštědla použitá k přípravě obsahují vhodné antioxidanty, např. butylhydroxyanisol (0,02 g/l).

Zkoumadlo ve zmrzlém stavu nebo lyofilizované je použitelné 3 měsíce.

Zkoumadlo difenylkarbazon-rtuťnaté R

Roztok I. 0,10 g *difenylkarbazonu R* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 50 ml.
Roztok II. 1,0 g *chloridu rtuťnatého R* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 50 ml.

Stejné objemy obou roztoků se smíchají.

Zkoumadlo dinitrofenylhydrazinové R

0,20 g *dinitrofenylhydrazinu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R* a přidá se 80 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS* a *kyseliny octové R.*

Připravuje se v čas potřeby.

Zkoumadlo dithiolové R

K 1,0 g *dithiolu R* se přidají 2 ml *kyseliny thioglykolové R* a zředí se roztokem *hydroxidu sodného R* (20 g/l) na 250 ml. Připraví se v čas potřeby.

Zkoumadlo fosfomolybdenan-wolframové R

100 g *wolframanu sodného R* a 25 g *molybdenanu sodného R* se rozpustí v 700 ml *vody R*. Přidá se 100 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 50 ml *kyseliny fosforečné R*. Potom se ve skleněné aparatuře zahřívá pod zpětným chladičem po dobu 10 h. Přidá se 150 g *síranu lithného R*, 50 ml *vody R* a několik kapek *bromu R*. Směs se vaří do odstranění přebytku bromu (15 min), ochladí se, zředí se *vodou R* na 1000 ml a zfiltruje se. Zkoumadlo je žluté. Jestliže je zbarvené do zelena, je pro použití nevhodné. Může se opět regenerovat vařením s několika kapkami *bromu R*. Přitom se přebytek bromu opět odstraní vařením.

Uchovává se při 2 °C až 8 °C.

Zkoumadlo fosfomolybdenan-wolframové zředěné RS

Smíchají se objemové díly *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* a *vody R* (1 + 2).

Zkoumadlo fosfomolybdenové R

2,5 g *kyseliny fosfomolybdenové R* se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 50 ml. Přidá se 2,5 ml *kyseliny sírové R* a zamíchá se.

Zkoumadlo fosfornanové R

10 g *fosfornanu sodného R* se rozpustí mírným zahříváním ve 20 ml *vody R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou R* na 100 ml. Nechá se stát a potom se slije nebo filtruje přes skelnou vatu.

Zkoumadlo ftaldialdehydové R

2,47 g *kyseliny borité R* se rozpustí v 75 ml *vody R*, upraví se pH na 10,4 roztokem *hydroxidu draselného R* (450 g/l) a zředí se *vodou R* na 100 ml. 1,0 g *ftaldialdehydu R* se rozpustí v 5 ml *methanolu R*, přidá se 95 ml *kyseliny borité RS* a 2 ml *kyseliny thioglykolové R* a upraví se pH na 10,4 roztokem *hydroxidu draselného R* (450 g/l).

Uchovává se chráněno před světlem, doba použitelnosti je 3 dny.

Zkoumadlo chlorid titanitý-kyselina sírová R

Opatrně se smíchá 20 ml *chloridu titanitého RS* s 13 ml *kyseliny sírové R*. Přidá se tolik *peroxidu vodíku koncentrovaného R*, až vznikne žluté zbarvení. Zahřívá se až do vzniku bílé páry, ochladí se a zředí se *vodou R*. Odpařování a přidávání *vody R* se opakuje tak dlouho, dokud se nezíská bezbarvý roztok. Zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkoumadlo chlorid železitý-kyselina amidosírová R

Roztok obsahující 1,0 g *chloridu železitého R* a 1,6 g *kyseliny amidosírové R* ve 100 ml.

Zkoumadlo isatinové R

6,0 mg *síranu železitého R* se rozpustí v 8 ml *vody R* a opatrně se přidá 50 ml *kyseliny sírové R*. Přidá se 6,0 mg *isatinu R* a míchá se do rozpuštění. Zkoumadlo smí být slabě žluté, ale ne oranžové nebo červené.

Zkoumadlo jodistanové R

0,446 g *jodistanu sodného R* se rozpustí v 2,5 ml roztoku *kyseliny sírové R* 25% (*V/V*) a zředí se *kyselinou octovou ledovou R* na 100,0 ml.

Zkoumadlo jodoplatičité R

Ke 3 ml roztoku *kyseliny hexachloroplatičité R* (100 g/l) se přidá 97 ml *vody R* a 100 ml roztoku *jodidu draselného R* (60 g/l).

Uchovává se chráněno před světlem.

Zkoumadlo methoxyfenyloctové R

2,7 g *kyseliny methoxyfenyloctové R* se rozpustí v 6 ml *tetramethylamoniumhydroxidu RS* a přidá se 20 ml *ethanolu R*.

Uchovává se v polyethylenových nádobách.

Zkoumadlo Millonovo R

3 ml *rtuti R* se rozpustí ve 27 ml *kyseliny dusičné dýmavé R*. Roztok se zředí stejným objemovým dílem *vody R*.

Uchovává se nejvýše 2 měsíce, chráněno před světlem.

Zkoumadlo molybdenan-hexaamonné R

V uvedeném pořadí se smíchá 1 objemový díl *molybdenanu hexaamonného R* (25 g/l) s 1 objemovým dílem roztoku *kyseliny askorbové R* (100 g/l) a s 1 objemovým dílem *kyseliny sírové R* (294,5 g/l H_2SO_4). Ke směsi se přidají 2 objemové díly *vody R*.

Zkoumadlo je použitelné 1 den.

Zkoumadlo molybdenan-hexaamonné R1

10 ml roztoku *hydrogenarseničnanu sodného R*, 50 ml *molybdenanu hexaamonného RS*, 90 ml *kyseliny sírové zředěné RS* se smíchá a zředí se *vodou R* na 200 ml.

Směs se nechá stát při 37 °C 24 h a uchovává se v hnědožlutých lahvích.

Zkoumadlo molybdenan-vanadičné R

Ve 150ml kádince se smíchají 4,0 g jemně práškovaného *molybdenanu hexaamonného R* a 0,1 g jemně práškovaného *vanadičnanu amonného R* a přidá se 70 ml *vody R*. Po rozpuštění se přidá 20 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Zkoumadlo molybdenan-vanadičné R2

Roztok I. 10 g *molybdenanu hexaamonného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 1 ml *amoniaku 17,5% RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Roztok II. 2,5 g *vanadičnanu amonného R* se rozpustí v horké *vodě R*, přidá se 14 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 500 ml.

96 ml *kyseliny dusičné R* se smíchá se 100 ml roztoku I, 100 ml roztoku II a zředí se *vodou R* na 500 ml.

Zkoumadlo ninhydrinové s chloridem cínatým R

0,20 g *ninhydrinu R* se rozpustí asi ve 4 ml teplé *vody R*, přidá se 5 ml roztoku *chloridu cínatého R* (1,6 g/l), nechá se stát 30 min, potom se přefiltruje a uchovává se při teplotě 2 °C až 8 °C. V čas potřeby se smíchá 2,5 ml tohoto roztoku s 5 ml *vody R* a 45 ml *2-propanolu R*.

Zkoumadlo ninhydrinové s chloridem cínatým R1

4,0 g *ninhydrinu R* se rozpustí ve 100 ml *methoxyethanolu R*. Jemně se protřepe s 1 g *katexu R* (300 μm až 840 μm) a přefiltruje se (roztok a). 0,16 g *chloridu cínatého R* se rozpustí ve 100 ml *tlumivého roztoku o pH 5,5* (roztok b). V čas potřeby se smíchají stejné objemy obou roztoků.

Zkoumadlo propionanhydridové R

1,0 g *kyseliny 4-toluensulfonové R* se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové ledové R*. Přidá se 5 ml *anhydridu kyseliny propionové R*. Zkoumadlo se použije po 15 min po přípravě a uchovává se jen 24 h.

Zkoumadlo resorcinolové R

K 80 ml *kyseliny chlorovodíkové R* se přidá 10 ml roztoku *resorcinolu R* (20 g/l) a přidá se 0,25 ml roztoku *síranu měďnatého R* (25 g/l) a zředí se *vodou R* na 100 ml. Roztok se připraví nejméně 4 h před použitím.

Uchováváno při teplotě 2 °C až 8 °C je použitelné jeden týden.

Zkoumadlo tetramethyldiaminodifenylmethanové R

Roztok A. 2,5 g *tetramethyldiaminodifenylmethanu R* se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 50 ml *vody R*.
Roztok B. 5 g *jodidu draselného R* se rozpustí ve 100 ml *vody R*.
Roztok C. 0,30 g *ninhydrinu R* se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 90 ml *vody R*.

Smíchá se roztok A, roztok B a 1,5 ml roztoku C.

Zkoumadlo tetraaminměďnaté R

Viz odstavec *Hydroxid tetraaminměďnatý RS*.

Zkoumadlo thioacetamidové R

0,2 ml *thioacetamidu RS* se smíchá s 1 ml směsi složené z 5 ml *vody R*, 15 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 20 ml *glycerolu 85% R*. Směs se zahřívá 20 s ve vodní lázni. Připravuje se v čas potřeby.

Zkoumadlo tromboplastinové R

1,50 g práškového *hovězího mozku sušeného R* se třepe 10 min až 15 min se 60 ml *vody R* při 50 °C. Odstřeďuje se 2 min při 1500 ot/min a supernatantní tekutina se slije. Pokud je extrakt uložený v chladničce, zůstane aktivní po dobu několika dní. Jako protimikrobní přísadu možno přidat *o-kresol R* (3 g/l).

Zkoumadlo vanilinové R

K 100,0 ml roztoku *vanilinu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* se přidají opatrně po kapkách 2,0 ml *kyseliny sírové R*.

Je použitelné 48 h od přípravy.

Žaludeční šťáva umělá R

2,0 g *chloridu sodného R* a 3,2 g *pepsinu R* se rozpustí ve *vodě R*. Přidá se 80 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000 ml.

Želatina hydrolyzovaná R

50 g *želatiny R* se rozpustí v 1000 ml *vody R*. Autoklavuje se 90 min v nasycené páře při 121 °C a lyofilizuje se.

Želatina R

Viz článek *Gelatina*.

Železo

Fe A_r 55,85 CAS 7439-89-6

Našedlý prášek nebo drát, dobře rozpustný ve zředěných minerálních kyselinách.

Žluť dimethylová R

$C_{14}H_{15}N_3$ M_r 225,3 CAS 60-11-7

Colour Index 11020, Schultz 28

4-Dimethylaminoazobenzen; žluť methylová

Malé žluté až oranžové krystalky nebo plátky. Je prakticky nerozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%.

Chromatografie (*2.2.27*). Na vrstvu *silikagelu G R* se nanese 10 μl roztoku (0,1 g/l) v *dichlormethanu R* a vyvíjí se stejným rozpouštědlem po dráze 10 cm. Na získaném chromatogramu je přítomna jen jedna hlavní skvrna.

Žluť metanilová R

$C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$ M_r 375,4 CAS 587-98-4

Colour Index 13065, Schultz 169

Sodná sůl kyseliny 4′-anilinoazobenzen-3-sulfonové

Nahnědle žlutý prášek, dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Žluť metanilová RS

Roztok 1,0 g/l v *methanolu R*.

Zkouška citlivosti. K 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* se přidá 0,1 ml roztoku žluti metanilové. Po přidání 0,05 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* se růžovočervené zbarvení změní na fialové.

Barevný přechod. pH 1,2 (červená) až pH 2,3 (oranžovožlutá).

Žluť naftolová S R

$C_{10}H_4N_2Na_2O_8S$ M_r 358,2 CAS 846-70-8

Colour Index 10316

Disodná sůl kyseliny 8-hydroxy-5,7-dinitro-2-naftalensulfonové

Žlutý nebo oranžově žlutý prášek, snadno rozpustný ve vodě.

Chromatografie (2.2.27). Zkouší se za podmínek předepsaných v článku *Plantaginis folium*. Na vrstvu se nanese 20 μl roztoku žluti naftolové (5 g/l) v *methanolu R*. Na chromatogramu je žlutá skvrna s R_F asi 0,5.

Žluť titanová R

$C_{28}H_{19}N_5Na_2O_6S_4$ M_r 696,0 CAS 1829-00-1

Colour Index 19540, Schultz 280

Disodná sůl kyseliny 2,2′-[(1-triazen-1,3-diyl)di-4,1-fenylen]bis[6-methylbenzothiazol-7-sulfonové]; thiazolová žluť.

Žlutohnědý prášek, snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Žluť titanová RS

Roztok 0,50 g/l.

Zkouška citlivosti. K 0,1 ml roztoku žluti titanové se přidá 10 ml *vody R*, 0,2 ml základního *roztoku hořčíku (10 μg Mg/ml)* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS*. V porovnání se současně stejným způsobem připraveným kontrolním roztokem bez přidání roztoku hořčíku se směs zbarví zřetelně růžově.

4.1.2 Základní roztoky pro limitní stanovení nečistot

Roztok acetaldehydu (100 μg C_2H_4O/ml)

1,0 g *acetaldehydu R* se rozpustí ve *2-propanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku zředí *2-propanolem R* na 500,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok acetaldehydu (100 μg C_2H_4O/ml) (1)

1,0 g *acetaldehydu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 500,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok amonia (100 μg NH_4/ml)

Množství *chloridu amonného R* odpovídající 0,741 g NH_4Cl se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 10,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 25,0 ml.

Roztok amonia (2,5 μg NH_4/ml)

Množství *chloridu amonného R* odpovídající 0,741 g NH_4Cl se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok amonia (1 μg NH_4/ml)

2,0 ml *roztoku amonia (2,5 μg NH_4/ml)* se zředí *vodou R* na 5,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok antimonu (1 μg Sb/ml)

Množství *vínanu draselno-antimonitého R* odpovídající 0,274 g $C_4H_4KO_7Sb$. $0,5H_2O$ se rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a čirý roztok se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 200 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Ke 100,0 ml tohoto roztoku se přidá 300 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Zředěné roztoky se připraví v čas potřeby.

Roztok arsenu (10 μg As/ml)

Množství *oxidu arsenitého R* odpovídající 0,330 g As_2O_3 se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok arsenu (1 μg As/ml)

1,0 ml *roztoku arsenu (10 μg As/ml)* se v čas potřeby zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok arsenu (0,1 μg As/ml)

1,0 ml *roztoku arsenu (1 μg As/ml)* se v čas potřeby zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok barya (50 μg Ba/ml)

Množství *chloridu barnatého R* odpovídající 0,178 g $BaCl_2$. $2H_2O$ se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou destilovanou R* na 20,0 ml.

Roztok cínu (5 μg Sn/ml)

Množství *cínu R* odpovídající 0,500 g Sn se rozpustí ve směsi 25 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 5 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí směsí 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 97,5 ml *vody R* na 100,0 ml.

Roztok cínu (0,1 μg Sn/ml)

1,0 ml *roztoku cínu (5 μg Sn/ml)* se v čas potřeby zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Roztok draslíku (100 μg K/ml)

Množství *síranu draselného R* odpovídající 0,446 g K_2SO_4 se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml zředí *vodou R* na 20,0 ml.

Roztok draslíku (20 μg K/ml)

1,0 ml *roztoku draslíku (100 μg K/ml)* se zředí *vodou R* na 5,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok dusičnanů (100 μg NO_3/ml)

Množství *dusičnanu draselného R* odpovídající 0,815 g KNO_3 se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok dusičnanů (10 μg NO_3/ml)

1,0 ml *roztoku dusičnanů (100 μg NO_3/ml)* se ředí *vodou R* na 10,0ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok dusičnanů (2 μg NO_3/ml)

1,0 ml *roztoku dusičnanů (10 μg NO_3/ml)* se ředí *vodou R* na 5,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok fluoridů (10 μg F/ml)

Fluorid sodný R se suší 12 h při 300 °C. Množství vysušeného *fluoridu sodného R* odpovídající 0,442 g NaF se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml (1 ml = 0,2 mg F). Roztok se uchovává v polyethylenové nádobě. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 20,0 ml.

Roztok fluoridů (1 μg F/ml)

1,0 ml *roztoku fluoridů (10 μg F/ml)* se ředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok formaldehydu (5 μg CH_2O/ml)

3,0 g *formaldehydu R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 200,0 ml.

Roztok fosforečnanů (5 μg PO_4/ml)

Množství *dihydrogenfosforečnanu draselného R* odpovídající 0,716 g KH_2PO_4 se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok glyoxalu (20 μg $C_2H_2O_2$/ml)

Do 100ml odměrné baňky se odváží množství *glyoxalu RS* odpovídající 0,200 g $C_2H_2O_2$ a zředí se po značku *ethanolem R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Roztok hexakyanoželezitanu (50 μg $Fe(CN)_6$/ml)

Množství *hexakyanoželezitanu draselného R* odpovídající 0,78 g $K_3Fe(CN)_6$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok hexakyanoželeznatanu (100 μg $Fe(CN)_6$/ml)

Množství *hexakyanoželeznatanu draselného R* odpovídající 0,20 g $K_4Fe(CN)_6 . 3H_2O$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok hliníku (200 μg Al/ml)

Množství *síranu draselno-hlinitého* odpovídající 0,352 g $KAl(SO_4)_2 . 12H_2O$ se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok hliníku (100 μg Al/ml)

8,947 g *chloridu hlinitého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok hliníku (10 μg Al/ml)

Množství *dusičnanu hlinitého* odpovídající 1,39 g $Al(NO_3)_3 .9H_2O$ se rozpustí ve*vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok hliníku (2 μg Al/ml)

Množství *síranu draselno-hlinitého* odpovídající 0,352 g $AlK(SO_4)_2 . 12H_2O$ se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok hořčíku (100 μg Mg/ml)

Množství *síranu hořečnatého R* odpovídající 1,010 g $MgSO_4 . 7H_2O$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok hořčíku (10 μg Mg/ml)

1,0 ml *roztoku hořčíku (100 μg Mg/ml)* se ředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok hořčíku (10 μg Mg/ml) (1)

3,365 g *chloridu hořečnatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok chloridů (8 μg Cl/ml)

Množství *chloridu sodného R* odpovídající 1,32 g NaCl se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok chloridů (5 μg Cl/ml)

Množství *chloridu sodného R* odpovídající 0,824 g NaCl se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok chromu (100 µg Cr/ml)

Množství *dichromanu draselného R* odpovídající 0,283 g $K_2Cr_2O_7$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Roztok chromu (0,1 µg Cr/ml)

1,0 ml *roztoku chromu (100 µg Cr/ml)* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok jodu (10 µg I/ml)

Množství *jodidu draselného R* odpovídající 0,131 g KI se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok kadmia (1 mg Cd/ml)

Množství *kadmia R* odpovídající 0,100 g Cd se rozpustí v minimálním množství směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*) na 100,0 ml.

Roztok kadmia (10 µg Cd/ml)

1,0 ml *roztoku kadmia (1 mg Cd/ml)* se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*) na 100,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok mědi (1 mg Cu/ml)

Množství *síranu měďnatého R* odpovídající 0,393 g $CuSO_4 . 5H_2O$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Roztok mědi (10 µg Cu/ml)

1,0 ml *roztoku mědi (1 mg Cu/ml)* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok mědi (0,1 µg Cu/ml)

1,0 ml *roztoku mědi (10 µg Cu/ml)* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok niklu (10 µg Ni/ml)

Množství *síranu nikelnatého R* odpovídající 4,780 g $NiSO_4 . 7H_2O$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok niklu (0,1 µg Ni/ml)

1,0 ml *roztoku niklu (10 µg Ni/ml)* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok olova (1 mg Pb/ml)

Množství *dusičnanu olovnatého R* odpovídající 0,400 g $Pb(NO_3)_2$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 250,0 ml.

Roztok olova (100 μg Pb/ml)

1,0 ml *roztoku olova (1 mg Pb/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok olova (10 μg Pb/ml)

1,0 ml *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok olova (10 μg Pb/ml) (1)

0,160 g *dusičnanu olovnatého R* se rozpustí ve 100 ml *vody R*, ke které byl přidán 1 ml *kyseliny dusičné prosté olova R*, a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok olova (2 μg Pb/ml)

1,0 ml *roztoku olova (10 μg Pb/ml)* se zředí *vodou R* na 5,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok olova (1 μg Pb/ml)

1,0 ml *roztoku olova (10 μg Pb/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok olova (0,1 μg Pb/ml)

1,0 ml *roztoku olova (1 μg Pb/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok platiny (30 μg Pt/ml)

80 mg *kyseliny hexachloroplatičité R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Roztok rtuti (1 mg Hg/ml)

Množství *chloridu rtuťnatého R* odpovídající 1,354 g $HgCl_2$ se rozpustí v 50 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Roztok selenu (100 μg Se/ml)

0,100 g *selenu R* se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se do sucha. Zbytek po odpaření se převede do 2 ml *vody R*, odpaří se do sucha, což se opakuje třikrát.

Zbytek po odpaření se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a stejným rozpouštědlem se zředí na 1000,0 ml.

Roztok selenu (1 μg Se/ml)

Množství *kyseliny seleničité R* odpovídající 6,54 mg H_2SeO_3 se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 40,0 ml.

Roztok síranů (100 μg SO_4/ml)

Množství *síranu draselného R* odpovídající 1,81 g K_2SO_4 se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.

Roztok síranů (10 μg SO_4/ml)

Množství *síranu draselného R* odpovídající 0,181 g K_2SO_4 se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.

Roztok síranů (10 μg SO_4/ml) (1)

Množství *síranu draselného R* odpovídající 0,181 g K_2SO_4 se rozpustí v *lihu R* 30% (*V/V*) a zředí se jím na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Roztok siřičitanů (1,5 μg SO_2/ml)

Množství *disiřičitanu sodného R* odpovídající 0,152 g $Na_2S_2O_5$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 3,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok sodíku (200 μg Na/ml)

Množství *chloridu sodného R* odpovídající 0,509 g NaCl se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok sodíku (50 μg Na/ml)

2,5 ml *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok stříbra (5 μg Ag/ml)

Množství *dusičnanu stříbrného R* odpovídající 0,790 g $AgNO_3$ se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok thalia (10 μg Tl/ml)

Množství *síranu thalného R* odpovídající 0,1235 g Tl_2SO_4 se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9,0 g/l) a zředí se jím na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Roztok titanu (100 μg Ti/ml)

100,0 mg *titanu R* se rozpustí ve 100 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml, je-li třeba zahřátím. Nechá se ochladit a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Roztok vanadu (1 mg V/ml)

Množství *vanadičnanu amonného R* odpovídající 0,230 g NH_4VO_3 se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Roztok vápníku (400 μg Ca/ml)

Množství *uhličitanu vápenatého R* odpovídající 1,000 g $CaCO_3$ se rozpustí ve 23 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou destilovanou R* na 10,0 ml.

Roztok vápníku (100 μg Ca/ml)

Množství *uhličitanu vápenatého R* odpovídající 0,624 g $CaCO_3$ se rozpustí ve 3 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 250,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou destilovanou R* na 10,0 ml.

Roztok vápníku (100 μg Ca/ml) (1)

Množství *chloridu vápenatého bezvodého R* odpovídající 2,769 g $CaCl_2$ se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok vápníku (100 μg Ca/ml) v lihu

Množství *uhličitanu vápenatého R* odpovídající 2,50 g $CaCO_3$ se rozpustí v 12 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *lihem 96% R* na 10,0 ml.

Roztok vápníku (10 μg Ca/ml)

Množství *uhličitanu vápenatého R* odpovídající 0,624 g $CaCO_3$ se rozpustí ve 3 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 250,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.

Roztok zinku (5 mg Zn/ml)

Množství *oxidu zinečnatého R* odpovídající 3,150 g ZnO se rozpustí v 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Roztok zinku (100 μg Zn/ml)

K množství *síranu zinečnatého R* odpovídajícímu 0,440 g $ZnSO_4 . 7H_2O$ se přidá 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok zinku (10 μg Zn/ml)

1 ml *roztoku zinku (100 μg Zn/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok zinku (5 μg Zn/ml)

1 ml *roztoku zinku (100 μg Zn/ml)* se zředí *vodou R* na 20,0 ml. Připraví se v čas potřeby.

Roztok zirkonu (1 mg Zr/ml)

Množství *dusičnan-oxidu zirkoničitého R* odpovídající 0,2930 g $ZrO(NO_3)_2 . 2H_2O$ se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (2 + 8) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.

Roztok železa (250 μg Fe/ml)

4,840 g *chloridu železitého R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (150 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 40,0 ml.

Roztok železa (20 μg Fe/ml)

Množství *síranu amonno-železitého R* odpovídající 0,863 g $FeNH_4(SO_4)_2 . 12H_2O$ se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok železa (10 μg Fe/ml)

Množství *síranu amonno-železitého R* odpovídající 7,022 g $FeNH_4(SO_4)_2 . 6H_2O$ se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Roztok železa (8 μg Fe/ml)

80 mg *železa R* se rozpustí v 50 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (220 g/l HCl) a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Roztok železa (2 μg Fe/ml)

1,0 ml *roztoku železa (20 μg Fe/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Roztok železa (1 μg Fe/ml)

1,0 ml *roztoku železa (20 μg Fe/ml)* se zředí *vodou R* na 20,0 ml. Připravuje se v čas potřeby.

4.1.3 Tlumivé roztoky

Tlumivý roztok acetonový

8,15 g *octanu sodného R* a 42,0 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 68,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a 150,0 ml *acetonu R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 2,0

6,57 g *chloridu draselného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 119,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 2,0

8,95 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, 3,40 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*) roztoku *kyselinou fosforečnou R*.

Tlumivý roztok o pH 2,5

100 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí v 800 ml *vody R*, pH (*2.2.3*) roztoku se upraví na 2,5 *kyselinou chlorovodíkovou R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 2,5 (1)

K 4,9 g *kyseliny fosforečné zředěné RS* se přidá 250 ml *vody R*, pH (*2.2.3*) roztoku se upraví *hydroxidem sodným zředěným RS* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 3,0 (1)

0,7 ml *kyseliny fosforečné R* se smíchá se 100 ml *vody R* a zředí se jí na 900 ml, pH (*2.2.3*) roztoku se upraví *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 3,0

21,0 g *kyseliny citronové R* se rozpustí ve 200 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. 40,3 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 3,2

K 900 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (4 g/l) se přidá 100 ml roztoku *kyseliny fosforečné R* (2,5 g/l). Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3)* roztoku.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 3,5

68,0 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R,* zředí se jí na 1000,0 ml a upraví se pH (*2.2.3*) roztoku *kyselinou fosforečnou R.*

Tlumivý roztok o pH 3,5

25,0 g *octanu amonného R* se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 38,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a upraví se pH (*2.2.3*) roztoku dle potřeby *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* nebo *amoniakem zředěným RS1*. Zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 3,6

K 250,0 ml *hydrogenftalanu draselného 0,2 mol/l RS* se přidá 11,94 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 3,7

K 15,0 ml *kyseliny octové R* se přidá 60 ml *lihu 96% R*, 20 ml *vody R*, pH *(2.2.3*) se upraví *amoniakem 17,5 % R* na 3,7 a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok se síranem měďnatým o pH 4,0

0,25 g *síranu měďnatého R* a 4,5 g *octanu amonného R* se rozpustí v *kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 100,0 ml.

Tlumivý roztok octanový o pH 4,4

136 g *octanu sodného R* a 77 g *octanu amonného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Tento roztok se smíchá s 250,0 ml *kyseliny octové ledové R*.

Tlumivý roztok hydrogenftalanový o pH 4,4

2,042 g *hydrogenftalanu draselného R* se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 7,5 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 200,0 ml.

Tlumivý roztok octanový o pH 4,6

5,4 g *octanu sodného R* se rozpustí v 50,0 ml *vody R*, přidá se 2,4 g *kyseliny octové ledové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*) roztoku.

Tlumivý roztok jantaranový o pH 4,6

11,8 g *kyseliny jantarové R* se rozpustí ve směsi 600 ml *vody R* a 82 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok octanový o pH 4,7

136,1 g *octanu sodného R* se rozpustí v 500 ml *vody R*. 250 ml tohoto roztoku se smíchá s 250 ml *kyseliny octové zředěné RS* a dvakrát se vytřepe čerstvě připraveným a zfiltrovaným roztokem *dithizonu R* (0,10 g/l) v *chloroformu R*. Potom se třepe s *chloridem uhličitým R* do získání bezbarvé organické vrstvy. Vodná vrstva se filtruje, aby se odstranily stopy chloridu uhličitého.

Tlumivý roztok o pH 5,2

1,02 g *hydrogenftalanu draselného R* se rozpustí ve 30,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 5,5

54,4 g *octanu sodného R* se rozpustí, je-li třeba zahřátím na 35 °C, v 50,0 ml *vody R*. Po ochlazení se pomalu přidá 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, zamíchá se a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok octan-edetanový o pH 5,5

250 g *octanu amonného R* a 15 g *edetanu disodného R* se rozpustí ve 400 ml *vody R* a přidá se 125 ml *kyseliny octové ledové R*.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 5,5

Roztok I. 13,61 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.
Roztok II. 35,81 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

96,4 ml roztoku I a 3,6 ml roztoku II se smíchají.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 5,8

1,19 g *hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R* a 8,25 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok octanový o pH 6,0

100 g *octanu amonného R* se rozpustí ve 300 ml *vody R*, přidá se 4,1 ml *kyseliny octové ledové R*, dle potřeby se upraví pH (*2.2.3*) *amoniakem 17,5% R* nebo *kyselinou octovou R* a potom se zředí *vodou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok diethylamoniumfosforečnanový o pH 6,0

68 ml *kyseliny fosforečné R* se zředí *vodou R* na 500 ml. K 25 ml tohoto roztoku se přidá 450 ml *vody R* a 6 ml *diethylaminu R*, dle potřeby se upraví pH na 6 ± 0,05 (*2.2.3*) za použití *diethylaminu R* nebo *kyseliny fosforečné R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,0

63,2 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (71,5 g/l) se smíchá s 36,8 ml roztoku *kyseliny citronové R* (21,0 g/l).

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,0 (1)

6,8 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 1000,0 ml a upraví se pH (*2.2.3*) roztoku *hydroxidem sodným koncentrovaným RS*.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,0 (2)

K 250,0 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* se přidá 28,5 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,4 (1)

2,5 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, 2,5 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* a 8,2 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 950 ml *vody R*. Dle potřeby se upraví pH (*2.2.3*) roztoku na 6,4 *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* nebo *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS*. Zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,4

1,79 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, 1,36 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 7,02 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 6,5

60,5 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* a 46 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 100 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l RS* a 20 mg *chloridu rtuťnatého R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok imidazolový o pH 6,5

6,81 g *imidazolu R* a 1,23 g *síranu hořečnatého R* se rozpustí v 752 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*) roztoku a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,6

K 250,0 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* se přidá 89,0 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový s chloridem sodným o pH 6,8

1,0 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R*, 2,0 g *hydrogenfosforečnanu draselného R* a 8,5 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 900 ml *vody R*. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*) a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,8

77,3 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (71,5 g/l) se smíchá s 22,7 ml roztoku *kyseliny citronové R* (21,0 g/l).

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 6,8 (1)

K 51,0 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného* (27,2 g/l) se přidá 49,0 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (71,6 g/l). Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Uchovává se při teplotě 2 °C až 8 °C.

Tlumivý roztok o pH 7,0

K 1000 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (18,0 g/l) a *chloridu sodného R* (23,0 g/l) se přidá takové množství roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (7,8 g/l) a *chloridu sodného R* (23,0 g/l), aby vznikl roztok o pH 7,0 (asi 280 ml) (*2.2.3*). V tomto roztoku se rozpustí takové množství *azidu sodného R*, aby jeho koncentrace byla 0,2 g/l.

Tlumivý roztok maleinanový o pH 7,0

10,0 g *chloridu sodného R*, 6,06 g *trometamolu R* a 4,90 g *anhydridu kyseliny maleinové R* se rozpustí v 900 ml *vody R* a upraví se pH (*2.2.3*) roztokem *hydroxidu sodného R* (170 g/l) na 7,0 a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Uchovává se při teplotě 2 °C až 8 °C. Je použitelný 3 dny.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0

82,4 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (71,5 g/l) a 17,6 ml roztoku *kyseliny citronové R* (21,0 g/l) se smíchá.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 (1)

250,0 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l R* se smíchá se 148,2 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (8,0 g/l). Podle potřeby se upraví pH roztoku (*2.2.3*) a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 (2)

50,0 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (136 g/l) se smíchá se 29,5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Upraví se pH roztoku (*2.2.3*) na 7,0 ± 0,1.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 (0,067 mol/l)

Roztok I. 0,908 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Roztok II. 2,38 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
38,9 ml roztoku I a 61,1 ml roztoku II se smíchá, a je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 (0,1 mol/l)

1,361 g roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Upraví se pH (*2.2.3*) roztokem *hydrogenfosforečnanu sodného R* (35 g/l).

Tlumivý roztok o pH 7,2

K 250,0 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l R* se přidá 175,0 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,2

87,0 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (71,5 g/l) se smíchá s 13,0 ml roztoku *kyseliny citronové R* (21,0 g/l).

Tlumivý roztok fyziologický o pH 7,2

8,0 g *chloridu sodného R*, 0,20 g *chloridu draselného R*, 0,10 g *chloridu vápenatého bezvodého R*, 0,10 g *chloridu hořečnatého R*, 3,18 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* a 0,20 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnan-albuminový o pH 7,2

10,75 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, 7,6 g *chloridu sodného R* a 10 g *albuminu hovězího R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Podle potřeby se upraví pH (*2.2.3*) *hydroxidem sodným zředěným RS* nebo *kyselinou fosforečnou zředěnou RS*.

Tlumivý roztok imidazolový o pH 7,3

3,4 g *imidazolu R* a 5,8 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 18,6 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Tlumivý roztok trometamolový o pH 7,4

6,08 g *trometamolu R* a 8,77 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 500,0 ml *vody destilované R*. Přidá se 10,0 g *albuminu hovězího R*, upraví se pH (*2.2.3*) za použití *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový s chloridem sodným o pH 7,4

2,38 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, 0,19 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 8,0 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Tlumivý roztok fosforečnanový s chloridem sodným o pH 7,4

0,60 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R*, 6,4 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* a 5,85 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*.).

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,4

K 393,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* se přidá 250 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a promíchá se.

Tlumivý roztok barbitalový o pH 7,4

50 ml roztoku obsahujícího *octan sodný R* (19,44 g/l) a *barbital sodnou sůl R* (29,46 g/l) se smíchá s 50,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS.* Potom se přidá 20 ml roztoku *chloridu sodného R* (85 g/l) a zředí se *vodou R* na 250,0 ml.

Tlumivý roztok boritanový o pH 7,5

2,5 g *chloridu sodného R*, 2,85 g *tetraboritanu sodného R* a 10,5 g *kyseliny borité R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Uchovává se při teplotě 2 °C až 8 °C.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,5 (0,2 mol/l)

27,22 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí v 930 ml *vody R*, upraví se na pH 7,5 (*2.2.3*) roztokem *hydroxidu draselného R* (300 g/l) a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,5 (0,33 mol/l)

Roztok I. 119,31 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.
Roztok II. 45,36 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

85 ml roztoku I se smíchá s 15 ml roztoku II. Je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*).

Tlumivý roztok trometamolový o pH 7,5

7,27 g *trometamolu R* a 5,27 g *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R,* je-li třeba, upraví se pH (*2.2.3*) a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok trometamolový o pH 7,5 (1)

6,067 g *trometamolu R* se rozpustí ve *vodě R*, upraví se pH (*2.2.3*) *kyselinou chlorovodíkovou R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 8,0

K 50,0 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* se přidá 46,8 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 200,0 ml.

Tlumivý roztok boritanový o pH 8,0 (0,0015 mol/l)

0,572 g *tetraboritanu sodného R* a 2,94 g *chloridu vápenatého R* se rozpustí v 800 ml *vody R*. Upraví se pH (*2.2.3*) tohoto roztoku *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 8,0 (0,02 mol/l)

K 50,0 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* se přidá 46,8 ml roztoku *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 8,0 (1 mol/l)

136,1 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R,* upraví se pH (*2.2.3*) *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok trometamolový o pH 8,1

0,294 g *chloridu vápenatého R* se rozpustí ve 40 ml *trometamolu RS*, upraví se pH (*2.2.3*) *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok trometamol-glycinový o pH 8,3

6,0 g *trometamolu R* a 28,8 g *glycinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V čas potřeby se 1,0 ml tohoto roztoku zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Tlumivý roztok barbitalový o pH 8,4

8,25 g *barbitalu sodné soli R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok trometamol-albuminový o pH 8,4

6,1 g *trometamolu R*, 2,8 g *edetanu disodného R*, 10,2 g *chloridu sodného R* a 10 g *albuminu hovězího R* se rozpustí ve *vodě R*, upraví se na pH 8,4 (*2.2.3*) *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok trometamolový s edetanem disodným o pH 8,4

5,12 g *chloridu sodného R*, 3,03 g *trometamolu R* a 1,40 g *edetanu disodného R* se rozpustí v 250 ml *vody destilované R*, upraví se pH (*2.2.3*) na 8,4 *kyselinou chlorovodíkovou R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok trisacetatový o pH 8,5

0,294 g *chloridu vápenatého R* a 12,11 g *trometamolu R* se rozpustí ve *vodě R*, upraví se pH (*2.2.3*) *kyselinou octovou R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok barbitalový o pH 8,6 (1)

1,38 g *barbitalu R*, 8,76 g *barbitalu sodné soli R* a 0,38 g *mléčnanu vápenatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 9,0

Roztok I. 6,18 g *kyseliny borité R* se rozpustí v *chloridu draselném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 1000,0 ml.
Roztok II. Roztok *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS.*
1000,0 ml roztoku I se smíchá se 420,0 ml roztoku II.

Tlumivý roztok o pH 9,0 (1)

6,20 g *kyseliny borité R* se rozpustí v 500 ml *vody R*, upraví se pH (*2.2.3*) *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* (asi 41,5 ml) a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Tlumivý roztok s chloridem amonným o pH 9,5

33,5 g *chloridu amonného R* se rozpustí ve 150 ml *vody R*, přidá se 42,0 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Uchovává se v polyethylenových nádobách.

Tlumivý roztok s chloridem amonným o pH 10,0

5,4 g *chloridu amonného R* se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 35,0 ml *amoniaku 17,5% RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Tlumivý roztok diethanolaminový o pH 10,0

96,4 g *diethanolaminu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 400 ml. Přidá se 0,5 ml roztoku *chloridu hořečnatého R* (186,0 g/l), upraví se pH (*2.2.3*) *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Tlumivý roztok o pH 10,9

6,75 g *chloridu amonného R* se rozpustí v roztoku *amoniaku 17,5% RS* a zředí se jím na 100,0 ml.

Tlumivý roztok k úpravě celkové iontové síly

58,5 g *chloridu sodného R*, 57,0 ml *kyseliny octové ledové R*, 61,5 g *octanu sodného R* a 5,0 g *kyseliny cyklohexylendinitrilotetraoctové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. Upraví se pH (*2.2.3*) na hodnotu 5,0 až 5,5 roztokem *hydroxidu sodného R* (335 g/l) a zředí se *vodou destilovanou R* na 1000,0 ml.

4.2 Odměrná analýza

4.2.1 Základní látky pro odměrné roztoky

Základní látky pro odměrné roztoky jsou označeny písmeny *VR* a připravují se následujícími postupy.

Bromičnan draselný VR

$KBrO_3$ M_r 167,0 CAS 7758-01-2

Připravuje se překrystalizováním *bromičnanu draselného R* z vroucí *vody R* a následným vysušením při 180 °C do konstantní hmotnosti.

Hydrogenftalan draselný VR

$C_8H_5KO_4$ M_r 204,2 CAS 877-24-7

Hydrogenftalan draselný R se překrystalizuje z vroucí *vody R*, krystalky se oddělí při teplotě nad 35 °C a suší se při 110 °C do konstantní hmotnosti.

Chlorid sodný VR

NaCl M_r 58,44 CAS 7647-14-5

Na jeden objemový díl nasyceného roztoku *chloridu sodného R* se přidají dva objemové díly *kyseliny chlorovodíkové R*. Vyloučené krystaly se promyjí *kyselinou chlorovodíkovou RS*, která se odstraní zahříváním na vodní lázni. Krystaly se suší při 300 °C do konstantní hmotnosti.

Kyselina benzoová VR

$C_7H_6O_2$ M_r 122,1 CAS 65-85-0

Připravuje se sublimací *kyseliny benzoové R* ve vhodném sublimačním zařízení.

Kyselina sulfanilová VR

$C_6H_7NO_3S$ M_r 173,2 CAS 121-57-3

Připravuje se překrystalizováním *kyseliny sulfanilové R* z vroucí vody. Po filtraci se krystaly suší při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti.

Oxid arsenitý VR

As_2O_3 M_r 197,8 CAS 1327-53-3

Připravuje se sublimací *oxidu arsenitého R* ve vhodném sublimačním zařízení. Uchovává se nad *silikagelem bezvodým R*.

Uhličitan sodný VR

Na_2CO_3 M_r 106,0 CAS 97-19-8

Nasycený roztok *uhličitanu sodného R* se při pokojové teplotě zfiltruje, potom se pomalu do filtrátu zavádí plynný *oxid uhličitý R* a míchá se do vychladnutí. Po 2 h se vzniklá sraženina zfiltruje přes filtr ze slinutého skla, promyje se ledovou *vodou R* nasycenou oxidem uhličitým. Po

vysušení při 100 °C až 105 °C se zahřívá za občasného zamíchání při 270 °C až 300 °C do konstantní hmotnosti.

Zinek VR

Zn A_r 65,4 CAS 7440-66-6

Obsah zinku je nejméně 99,9 %.

4.2.2 Odměrné roztoky

Odměrné roztoky se připravují obvyklými chemickými analytickými postupy. Ověří se přesnost použité aparatury, zda je vhodná pro zamýšlené použití.

Koncentrace odměrných roztoků se uvádí v molaritě. Molarita vyjadřuje počet molů látky rozpuštěné v 1 litru roztoku. Roztok, který obsahuje x molů látky v litru, se označuje x mol/l.

Odměrné roztoky se neliší od předepsané koncentrace o více než ±10 %. Molarita odměrných roztoků se stanoví s přesností 0,2 %.

Voda používaná v odměrné analýze vyhovuje požadavkům článku *Aqua purificata*.

Stanovení titru odměrných roztoků se provádí postupy uvedenými dále. Když se odměrný roztok použije pro stanovení, ve kterém se určí bod ekvivalence elektrochemickým postupem (například ampérometricky nebo potenciometricky), stanovení titru odměrného roztoku se provede stejným postupem. Složení prostředí, ve kterém se provádí stanovení titru, má být stejné jako při vlastním stanovení.

Zředěné odměrné roztoky se připravují z roztoků popsaných dále jejich ředěním *vodou prostou oxidu uhličitého R*. Titr těchto odměrných roztoků je stejný jako titr připravených odměrných roztoků. Roztoky s molaritou nižší než 0,1 mol/l se připravují v čas potřeby.

Odměrné roztoky jsou označeny písmeny *VS*. Roztoky připravené v koncentraci mol/l podle níže uvedených postupů, u nichž nebyl stanoven titr, jsou v článcích označeny *RS*.

Arsenitan sodný 0,1 mol/l VS

Množství *oxidu arsenitého VR* odpovídající 4,946 g As_2O_3 se rozpustí ve směsi 20 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 20 ml *vody R* a zředí se jí na 400 ml. Potom se přidává *kyselina chlorovodíková zředěná RS*, dokud není roztok neutrální na *papír lakmusový R*. V roztoku se rozpustí 2 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Benzetoniumchlorid 0,004 mol/l VS

1,792 g *benzetoniumchloridu R* předem vysušeného do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Skutečná molarita roztoku se vypočítá ze stanovení obsahu benzetoniumchloridu, počítáno na vysušený $C_{27}H_{42}ClNO_2$. Stanoví se následovně: 0,350 g vysušené látky se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 6 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru. Současně se provede slepý pokus.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,81 mg $C_{27}H_{42}ClNO_2$.

Bromičnan draselný 0,033 mol/l VS

5,5670 g *bromičnanu draselného VR* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Bromičnan draselný 0,02 mol/l VS

3,340 g *bromičnanu draselného VR* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Bromičnan draselný 0,0167 mol/l s bromidem draselným VS

2,7835 g *bromičnanu draselného VR* a 13 g *bromidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Dichroman draselný 0,0167 mol/l VS

4,90 g *dichromanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 20,0 ml roztoku dichromanu draselného se přidá 1,0 g *jodidu draselného R* a 7 ml *kyseliny chlorovodíkové RS.* Přidá se 250 ml *vody R* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 3 ml *škrobu RS* z modrého zbarvení roztoku do světle zeleného.

Dusičnan olovnatý 0,1 mol/l VS

33,0 g *dusičnanu olovnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 20,0 ml roztoku dusičnanu olovnatého se přidá 300 ml *vody R* a obsah olova se stanoví chelatometricky (*2.5.11*).

Dusičnan rtuťnatý 0,02 mol/l VS

6,85 g *dusičnanu rtuťnatého R* se rozpustí ve 20 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 15,0 mg *chloridu sodného VR* se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se roztokem dusičnanu rtuťnatého za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) za použití merkurosulfatové srovnávací elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody.

1 ml *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* odpovídá 2,338 mg NaCl.

Dusičnan stříbrný 0,1 mol/l VS

17,0 g *dusičnanu stříbrného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 0,100 g *chloridu sodného VR* se rozpustí ve 30 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se připraveným roztokem dusičnanu stříbrného za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,844 mg NaCl.

Uchovává se chráněn před světlem.

Dusičnan stříbrný 0,001 mol/l VS

5,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* se zředí *vodou R* na 500,0 ml.

Dusitan sodný 0,1 mol/l VS

7,5 g *dusitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 0,300 g *kyseliny sulfanilové VR* se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a roztokem dusitanu sodného se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

Titr se stanovuje v čas potřeby.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,32 mg $C_6H_7NO_3S$.

Edetan disodný 0,1 mol/l VS

37,5 g *edetanu disodného R* se rozpustí v 500 ml *vody R*, přidá se 100 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 0,120 g *zinku VR* se rozpustí ve 4 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a přidá se 0,1 ml *bromové vody R*. Varem se odstraní přebytečný brom. Reakce roztoku se upraví *hydroxidem sodným zředěným RS* na slabě kyselou nebo neutrální. Obsah zinku se stanoví chelatometricky (*2.5.11*).

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 6,54 mg Zn.

Uchovává se v polyethylenové nádobě.

Edetan disodný 0,02 mol/l VS

7,444 g *edetanu disodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 0,100 g *zinku VR* se rozpustí ve 4 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a přidá se 0,1 ml *bromové vody R*. Varem se odstraní přebytečný brom a roztok se přelije do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se přenese do 100ml kuželové baňky a zředí se *vodou R* na 200 ml. Dále se přidá asi 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* a takové množství *methenaminu R,* až vznikne fialově růžové zbarvení. Dále se přidají 2,0 g *methenaminu R* a titruje se roztokem edetanu disodného do změny fialově růžového zbarvení na žluté.

1 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l VS* odpovídá 1,308 mg Zn.

Hexanitratoceričitan amonný 0,01 mol/l VS

K 100,0 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* se za chlazení přidá 30 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Hexanitratoceričitan amonný 0,1 mol/l VS

54,82 g *hexanitratoceričitanu amonného R* a 56 ml *kyseliny sírové R* se 2 min míchají. Přidá se pětkrát 100 ml *vody R* a po každém přidání se roztok promíchá. Čirý roztok se zředí *vodou R* na 1000,0 ml. Titr roztoku se stanoví 10 dní po přípravě.

Stanovení titru. 80,0 mg *oxidu arsenitého VR* se rozpustí mírným zahřátím v 15 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS*. K čirému roztoku se přidá 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 0,15 ml roztoku *oxidu osmičelého R* (2,50 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS* a 0,1 ml *feroinu RS*. Titruje se připraveným roztokem hexanitratoceričitanu amonného, ke konci titrace pomalu, až do vymizení červeného zbarvení.

1 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,946 mg As_2O_3.

Uchovává se chráněn před světlem.

Hydrogenftalan draselný 0,1 mol/l VS

V kuželové baňce obsahující asi 800 ml *kyseliny octové bezvodé R* se rozpustí 20,42 g *hydrogenftalanu draselného RV* a zahřívá se na vodní lázni do úplného rozpuštění za chránění před vlhkostí. Ochladí se na 20 °C a zředí se *kyselinou octovou bezvodou R* na 1000,0 ml.

Hydroxid draselný 0,1 mol/l VS

6,0 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 20,0 ml roztoku hydroxidu draselného se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

Hydroxid draselný v lihu 0,5 mol/l VS

3,0 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% prostým aldehydů R* na 100,0 ml.

Stanovení titru. 20,0 ml roztoku hydroxidu draselného v lihu se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

Hydroxid draselný 0,5 mol/l v lihu 60% VS

3,0 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v *lihu prostém aldehydů R* 60% (*V/V*) a zředí se jím na 100,0 ml.

Stanovení titru. 20,0 ml roztoku hydroxidu draselného v lihu 60% (*V/V*) se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

Hydroxid draselný v lihu 0,1 mol/l VS

20,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* se zředí *lihem 96% prostým aldehydů R* na 100,0 ml.

Hydroxid sodný 1 mol/l VS

42 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 20,0 ml roztoku hydroxidu sodného se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* za použití předepsaného indikátoru pro titraci.

Pokud je předepsáno použití odměrného roztoku hydroxidu sodného prostého uhličitanů, pak se při jeho přípravě postupuje následovně:

Hydroxid sodný R se rozpustí ve *vodě R* na koncentraci 400 g/l až 600 g/l a nechá se stát. Čirá supernatantní tekutina se slije za chránění před oxidem uhličitým a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na požadovanou molaritu. Roztok vyhovuje následující zkoušce:

20,0 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové stejné molarity se titruje roztokem hydroxidu sodného za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Po dosažení bodu ekvivalence se přidá nezbytné množství kyseliny chlorovodíkové k odbarvení roztoku a jeho objem se varem sníží na 20 ml. Během varu se přidá právě tolik kyseliny chlorovodíkové, až růžové zbarvení vzniklé varem zmizí a při dalším vaření se již neobjeví. Spotřebuje se nejvýše 0,10 ml kyseliny chlorovodíkové.

Hydroxid sodný 0,1 mol/l VS

100,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Provede se způsobem popsaným v odstavci *Hydroxid sodný 1 mol/l VS* za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Hydroxid sodný v ethanolu 0,1 mol/l VS

K 250 ml *ethanolu R* se přidá 3,3 g *hydroxidu sodného koncentrovaného RS.*

Stanovení titru. 0,200 g *kyseliny benzoové VR* se rozpustí ve směsi 2 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R.* Titruje se připraveným roztokem hydroxidu sodného v ethanolu za použití 0,2 ml *thymolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Chlorid barnatý 0,1 mol/l VS

24,4 g *chloridu barnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 10,0 ml roztoku chloridu barnatého se přidá 60 ml *vody R*, 3 ml *amoniaku 26% R*, 0,5 mg až 1,0 mg *ftaleinpurpuru R* a titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS.* Když se roztok začne odbarvovat, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a titruje se až do vymizení modrofialového zbarvení.

Chlorid hořečnatý 0,1 mol/l VS

20,33 g *chloridu hořečnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Množství hořčíku se stanoví chelatometricky (*2.5.11*).

Chlorid zinečnatý 0,05 mol/l VS

6,82 g *chloridu zinečnatého R* (váží se velmi opatrně) se rozpustí ve *vodě R.* Je-li potřeba, přidává se po kapkách *kyselina chlorovodíková R* do vymizí zákalu. Zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 20,0 ml roztoku chloridu zinečnatého se přidá 5 ml *kyseliny octové zředěné RS* a obsah zinku se stanoví chelatometricky (*2.5.1*).

Chloristan barnatý 0,05 mol/l VS

15,8 g *hydroxidu barnatého R* se rozpustí ve směsi 7,5 ml *kyseliny chloristé R* a 75 ml *vody R.* pH roztoku se upraví na hodnotu 3,0 přidáním *kyseliny chloristé R* a roztok se zfiltruje. Po přidání 150 ml *lihu 96% R* se zředí *vodou R* na 250 ml a *tlumivým roztokem o pH 3,7* se zředí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 5,0 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS* se přidá 5,0 ml *vody R*, 50 ml *tlumivého roztoku o pH 3,7* a 0,5 ml *alizarinu S RS.* Titruje se roztokem chloristanu barnatého do červenooranžového zbarvení. Titr se stanoví v čas potřeby.

Jod 0,01 mol/l VS

0,3 g *jodidu draselného R* se přidá k 20,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Jod 0,05 mol/l VS

12,7 g *jodu R* a 20 g *jodidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 80 mg *oxidu arsenitého VR* se rozpustí ve směsi 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R*. Přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 3,0 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a titruje se roztokem jodu za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 4,946 mg As_2O_3.

Uchovává se chráněn před světlem.

Jodičnan draselný 0,05 mol/l VS

10,70 g *jodičnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 25,0 ml roztoku jodičnanu draselného se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 20,0 ml tohoto roztoku se přidají 2,0 g *jodidu draselného R* a 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za přítomnosti 1 ml *škrobu RS*, který se přidá před koncem titrace.

Jodid draselný 0,001 mol/l VS

10,0 ml roztoku *jodidu draselného R* (166 g/l) se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 500,0 ml.

Jodosiřičité činidlo VS

Aparatura k přípravě roztoku musí být během přípravy uzavřená a suchá. Skládá se z nádoby s kulatým dnem o obsahu 3000 ml až 4000 ml opatřené otvory pro míchadlo, teploměr a s otvorem pro trubičku se sušidlem. Za stálého míchání se ke směsi 700 ml *pyridinu bezvodého R* a 700 ml *2-methoxyethanolu R* přidá 220 g jemně upráškovaného *jodu R* předem vysušeného nad *oxidem fosforečným R*. Míchá se do rozpuštění jodu (asi 30 min). Roztok se ochladí na -10 °C a rychle za stálého míchání se přidá 190 g kapalného *oxidu siřičitého R*, přičemž teplota nesmí překročit 30 °C. Roztok se ochladí.

Stanovení titru. Asi 20 ml *methanolu bezvodého R* se titruje jodosiřičitým činidlem způsobem uvedeným ve stati (*2.5.1*). Po dosažení bodu ekvivalence se přidá odpovídající, přesně odvážené množství *vody R* a znovu se titruje. Vypočítá se, kolik miligramů vody odpovídá 1 ml jodosiřičitého činidla.

1 ml jodosiřičitého činidla odpovídá nejméně 3,5 mg vody. Titr roztoku se stanoví bezprostředně před použitím.

Při práci je nutná ochrana před vlhkostí. Roztok se uchovává v suché nádobě.

Kyselina dusičná 1 mol/l VS

96,6 g *kyseliny dusičné R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 2,000 g *uhličitanu sodného VR* se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *oranže methylové RS* a titruje se roztokem kyseliny dusičné do první změny zbarvení na červenožluté. Potom se vaří 2 min, přičemž se zbarvení roztoku změní na žluté. Po ochlazení se dotitruje do červenožlutého zbarvení.

1 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l VS* odpovídá 53,00 mg Na_2CO_3.

Kyselina chloristá 0,1 mol/l VS

K 900 ml *kyseliny octové ledové R* se v odměrné baňce za míchání přidá 8,5 ml *kyseliny chloristé R*, 30 ml *acetanhydridu R* a zředí se *kyselinou octovou ledovou R* na 1000,0 ml. Směs se nechá stát 24 h. Stanoví se obsah vody semimikrostanovením (*2.5.12*) bez použití methanolu, a je-li třeba, upraví se obsah vody na 0,1 % až 0,2 % přidáním *acetanhydridu R* nebo *vody R*. Opět se nechá stát 24 h.

Stanovení titru. 0,350 g *hydrogenftalanu draselného VR* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Po ochlazení, při němž je třeba roztok chránit před vlivem vzduchu, se titruje roztokem kyseliny chloristé za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS*. Je potřebné sledovat teplotu roztoku kyseliny chloristé v průběhu stanovení titru.

Je-li teplota při stanovení obsahu odlišná od teploty při stanovení titru kyseliny chloristé, provede se korekce objemu kyseliny chloristé použité na stanovení obsahu následovně:

$$V_c = V\,[1 + (t_1 - t_2)\,0{,}0011]\,,$$

t_1 - teplota při stanovení titru,
t_2 - teplota při stanovení obsahu,
V_c - korigovaný objem,
V - nalezený objem při stanovení obsahu.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,42 mg $C_8H_5KO_4$.

Kyselina chloristá 0,05 mol/l VS

50,0 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* se zředí *kyselinou octovou bezvodou R* na 100,0 ml.

Kyselina chlorovodíková 1 mol/l VS

103,0 g *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 1,000 g *uhličitanu sodného VR* se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *oranže methylové RS* a titruje se roztokem kyseliny chlorovodíkové do první změny zbarvení na červenožluté. Potom se vaří 2 min, přičemž se zbarvení roztoku změní na žluté. Po ochlazení se dotitruje do červenožlutého zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 53,00 mg Na_2CO_3.

Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l VS

100,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Stanoví se způsobem uvedeným v odstavci *Kyselina chlorovodíková 1 mol/l VS* s navážkou 0,100 g *uhličitanu sodného VR*, který se rozpustí ve 20,0 ml *vody R*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,30 mg Na_2CO_3.

Kyselina sírová 0,5 mol/l VS

28 ml *kyseliny sírové R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. 1,000 g *uhličitanu sodného VR* se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *oranže methylové RS* a titruje se roztokem kyseliny sírové do první změny zbarvení na červenožlutě. Potom

se vaří 2 min, přičemž barva roztoku se změní na žlutou. Po ochlazení se dotitruje do červenožlutého zbarvení.

1 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l VS* odpovídá 53,00 mg Na_2CO_3.

Kyselina sírová 0,05 mol/l VS

100,0 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l VS* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Titr kyseliny sírové se stanoví způsobem uvedeným v odstavci *Kyselina sírová 0,5 mol/l VS* s navážkou *uhličitanu sodného VR* 0,100 g, která se rozpustí ve 20 ml *vody R.*

1 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS* odpovídá 5,30 mg Na_2CO_3.

Manganistan draselný 0,02 mol/l VS

3,2 g *manganistanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Roztok se zahřívá 1 h na vodní lázni, nechá se vychladnout a zfiltruje se přes filtr ze slinutého skla.

Stanovení titru. K 20,0 ml roztoku manganistanu draselného se přidají 2 g *jodidu draselného R* a 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátoru.

Titr se stanoví v čas potřeby.

Uchovává se chráněn před světlem.

Methoxid lithný 0,1 mol/l VS

0,694 g *lithia R* se rozpustí ve 150 ml *methanolu bezvodého R* a zředí se *toluenem R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 10 ml *dimethylformamidu R* se přidá 0,05 ml *modři thymolové R* (3 g/l) v *methanolu R* a titruje se roztokem methoxidu lithného do jasně modrého zbarvení. Ihned se přidá 0,200 g *kyseliny benzoové VR*, míchá se do rozpuštění a znovu se titruje roztokem methoxidu lithného do jasně modrého zbarvení. Roztok je v průběhu titrace nutné chránit před vzdušným oxidem uhličitým. Titr roztoku methoxidu lithného se vypočítá ze spotřeby získané při druhé titraci. Stanovení titru se provede v čas potřeby.

1 ml *methoxidu lithného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Methoxid sodný 0,1 mol/l VS

175 ml *methanolu bezvodého R* se ochladí v ledové vodě a po malých částech se přidává za chlazení asi 2,50 g čerstvě nařezaného *sodíku R.* Když se kov rozpustí, roztok se zředí *toluenem R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 10 ml *dimethylformamidu R* se přidá 0,05 ml *modři thymolové R* (3 g/l) v *methanolu R* a titruje se roztokem methoxidu sodného do jasně modrého zbarvení. Ihned se přidá 0,200 g *kyseliny benzoové VR*, míchá se do rozpuštění a znovu se titruje roztokem methoxidu sodného do jasně modrého zbarvení. Roztok je v průběhu titrace nutné chránit před vzdušným oxidem uhličitým. Titr roztoku methoxidu sodného se vypočítá ze spotřeby získané při druhé titraci. Stanovení titru se provede v čas potřeby.

1 ml *methoxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Síran amonno-železitý 0,1 mol/l VS

50,0 g *síranu amonno-železitého R* se rozpustí ve směsi 6 ml *kyseliny sírové R* a 300 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 25,0 ml roztoku síranu amonno-železitého se přidají 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 2 g *jodidu draselného R*. Roztok se nechá 10 min stát a potom se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 48,22 mg $FeNH_4(SO_4)_2 . 12H_2O$.

Síran ceričitý 0,1 mol/l VS

40,4 g *síranu ceričitého R* se rozpustí ve směsi 500 ml *vody R* a 50 ml *kyseliny sírové R*, nechá se ochladit a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 25,0 ml roztoku síranu ceričitého se přidají 2,0 g *jodidu draselného R* a 150 ml *vody R* a titruje se ihned *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu R* jako indikátoru.

Síran měďnatý 0,02 mol/l VS

5,00 g *síranu měďnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 20,0 ml roztoku síranu měďnatého se přidají 2,0 g *octanu sodného R* a 0,1 ml *pyridylazonaftolu RS* a titruje se roztokem *edetanu disodného 0,02 mol/l VS* do změny fialově modrého zbarvení na světle zelené. Před koncem titrace se titruje pomalu.

Síran zinečnatý 0,1 mol/l VS

29,0 g *síranu zinečnatého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Ke 20,0 ml roztoku síranu zinečnatého se přidá 5 ml *kyseliny octové zředěné RS* a obsah zinku se stanoví chelatometricky (*2.5.11*).

Síran železnatý 0,1 mol/l VS

27,80 g *síranu železnatého R* se rozpustí v 500 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 25,0 ml roztoku síranu železnatého se přidají 3 ml *kyseliny fosforečné R* a ihned se titruje *manganistanem draselným 0,02 mol/l VS*. Titr se stanoví v čas potřeby.

Tetrabutylamoniumhydroxid 0,1 mol/l VS

40 g *tetrabutylamoniumjodidu R* se rozpustí v 90 ml *methanolu bezvodého R*, přidá se 20 g jemně upráškovaného *oxidu stříbrného R* a silně se 1 h protřepává. Několik mililitrů se odstřeďuje a zkouší se na případnou přítomnost jodidů v supernatantní tekutině. Je-li reakce pozitivní, přidají se ještě 2,0 g *oxidu stříbrného R* a protřepává se ještě 30 min. Postup se opakuje, dokud kapalina není prostá jodidů. Směs se zfiltruje přes jemný filtr se slinutého skla, baňka a filtr se promyjí 3krát 50 ml *toluenu R*. Filtrát a promývací kapalina se spojí a roztok se zředí *toluenem R* na 1000,0 ml. Roztok se nechá 5 min probublávat dusíkem prostým oxidu uhličitého.

Stanovení titru. K 10 ml *dimethylformamidu R* se přidá 0,05 ml *modři thymolové R* v *methanolu R* (3 g/l) a titruje se roztokem tetrabutylamoniumhydroxidu do jasně modrého zbarvení. Ihned se přidá 0,200 g *kyseliny benzoové VR*, míchá se do rozpuštění a znovu se titruje roztokem tetrabutylamoniumhydroxidu do jasně modrého zbarvení. Roztok je v průběhu titrace nutné chránit před vzduš-

ným oxidem uhličitým. Titr roztoku tetrabutylamoniumhydroxidu se vypočítá ze spotřeby získané při druhé titraci. Stanovení titru se provede v čas potřeby.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Tetrabutylamoniumhydroxid v propanolu 0,1 mol/l VS

Roztok se připraví postupem uvedeným v odstavci *Tetrabutylamoniumhydroxid 0,1 mol/l VS* za použití *2-propanolu R* místo *toluenu R*.

Tetrasulfatoceričitan amonný 0,1 mol/l VS

65,0 g *tetrasulfatoceričitanu amonného R* se rozpustí ve směsi 500 ml *vody R* a 30 ml *kyseliny sírové R*. Po vychladnutí se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.

Stanovení titru. Stanoví se způsobem uvedeným v odstavci *Hexanitratoceričitan amonný 0,1 mol/l VS*. K titraci se použije roztok tetrasulfatoceričitanu amonného.

1 ml *tetrasulfatoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,946 mg As_2O_3.

Tetrasulfatoceričitan amonný 0,01 mol/l VS

Ke 100,0 ml roztoku *tetrasulfatoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* se za chlazení přidá 30 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Thiokyanatan amonný 0,1 mol/l VS

7,612 g *thiokyanatanu amonného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 20,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* se přidá 25 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se roztokem thiokyanatanu amonného za použití 2 ml *síranu amonno-železitého R* do červenožlutého zbarvení.

Thiosíran sodný 0,1 mol/l VS

25 g *thiosíranu sodného R* a 0,20 g *uhličitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Stanovení titru. K 10,0 ml *bromičnanu draselného 0,033 mol/l VS* se přidá 40 ml *vody R*, 10 ml *jodidu draselného RS* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a titruje se roztokem thiosíranu sodného za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru, který se přidá před koncem titrace.

Seznam referenčních látek použitých v národních článcích

N

5-Aminoimidazol-4-karboxamid hydrochlorid CRL (AICA)
2-Azahypoxanthin CRL (AHX)
Butamiraciumdihydrogencitrat CRL
Dakarbazin CRL
6,11-Dihydrodibenzo[b,e]thiepin-11-on CRL
11-(3-Dimethylaminopropyl)-6,11-dihydrodibenzo[b,e]thiepin-11-ol CRL
11-(3-Dimethylaminopropyliden)-6,11-dihydrodibenzo[b,e]thiepin-5-oxid (hydrochlorid) CRL
11-(3-Dimethylaminopropyliden)-6,11-dihydrodibenzo[b,e]thiepin-5,5-dioxid (hydrochlorid) CRL
Dosulepiniumchlorid CRL
Ethylbiskumacetat CRL
Hexachlorofen CRL
Hymechromon CRL
Choliniumjodid CRL
Kloroxin CRL
Kožní prášek CRL
Kyselina 2-(4-tolylmerkaptomethyl)benzoová CRL
Medosulepiniumchlorid CRL
Meglumin CRL
2-Methyl-5-nitroimidazol CRL
Ornidazol CRL
Suxamethoniumjodid CRL
Trimekainiumchlorid CRL
Troxerutin CRL
Xanthinoliumnikotinat CRL

560

5 Všeobecné dodatky

562 *Všeobecné dodatky*

5.1 Dodatky k technologii léčivých přípravků

5.1.1 Metody přípravy sterilních výrobků

Sterilita je nepřítomnost živých mikroorganismů. Sterilita výrobku se nemůže zaručit zkoušením, ale zajistí se použitím vhodných validovaných výrobních postupů. Je proto nezbytné prověřit vliv vybrané sterilizační metody výrobku (včetně jeho konečného obalu nebo balení) s ohledem na jeho účinnost a neporušenost. Rovněž je nezbytné tuto metodu validovat před jejím zavedením do praxe. Doporučuje se vybrat takový obal, který dovolí optimální způsob sterilizace. Není-li validovaný postup úzkostlivě dodržován, vzniká riziko nesterilního nebo poškozeného výrobku. Novou validaci je třeba provést při každé větší změně sterilizačního postupu, včetně změn v plnění sterilizátoru. Očekává se, že zásady správné výrobní praxe, jak jsou popsány např. v pokynech pro správnou výrobní praxi ES, se budou při návrhu postupu dodržovat, a to zvláště použitím:

- kvalifikovaného personálu s odpovídajícím školením,
- odpovídajících prostor,
- vhodného výrobního zařízení umožňujícího snadné čištění a sterilizaci,
- postačujících opatření k omezení mikrobiální kontaminace před sterilizací,
- validovaných postupů pro všechny kritické výrobní kroky,
- monitorování pracovního prostředí a postupů průběžných výrobních kontrol.

Opatření nezbytná pro minimalizaci mikrobiální kontaminace před sterilizací zahrnují použití vstupních materiálů s vhodně nízkou mikrobiální kontaminací. Mikrobiologické sledování a určení vhodných limitů může být vhodné pro složky, které se snadno kontaminují pro svůj původ, povahu nebo způsob přípravy.

Zde popsané metody se hlavně týkají inaktivace nebo odstranění bakterií, kvasinek a plísní. Pro biologické přípravky zvířecího nebo lidského původu nebo v případě, že takové materiály byly užity při výrobním postupu, je nezbytné při validaci prokázat, že postup je schopen odstranit nebo inaktivovat závažnou kontaminaci viry. Pokyny pro tyto postupy jsou např. v příslušných European Community Notes for Guidance.

Kdekoli je to možné, užívá se sterilizace v konečném obalu. Je-li užita plně validovaná sterilizace v konečném obalu párou, suchým teplem nebo ionizujícím zářením, může se se souhlasem oprávněné autority provádět parametrické uvolňování, což je uvolnění šarže sterilizovaných položek založené na údajích o postupu spíše než na základě předložení vzorku ke zkoušce na sterilitu.

Není-li sterilizace v konečném obalu možná, použije se filtrace filtry zadržujícími bakterie nebo aseptické zpracování. Kdekoli je to možné, použije se dodatečné ošetření výrobku (např. jeho zahřátí) v konečném obalu. Ve všech případech se požaduje, aby obal i uzávěr zajistily sterilitu výrobku po dobu jeho použitelnosti.

Hladina sterilizační jistoty

Ve vhodných případech se v dále uvedených metodách odkazuje na pojem "hladina sterilizační jistoty". Dosažení sterility u kteréhokoliv člena souboru členů podrobených sterilizaci nemůže být zaručeno ani prokázáno. Inaktivace mikroorganismů fyzikálními nebo chemickými prostředky sleduje exponenciální křivku. Zůstává tedy stále určitá statistická pravděpodobnost, že nějaký mikroorganismus může přežít sterilizační postup. Pro daný postup je pravděpodobnost přežití určena počtem, druhem a odolností přítomných mikroorganismů a prostředím, ve kterém se při ošetření nalézají. Hladina sterilizační jistoty sterilizačního postupu udává stupeň jistoty, s nímž

uvažovaný postup vysterilizuje soubor sterilizovaných členů. Hladina sterilizační jistoty daného postupu je vyjádřena jako pravděpodobnost výskytu nesterilních položek v tomto souboru. Např. hladina sterilizační jistoty 10^{-6} značí pravděpodobnost existence výskytu nejvýše jednoho životaschopného mikroorganismu v $1 \cdot 10^{6}$ položek konečného výrobku. Hladina sterilizační jistoty postupu pro daný výrobek se stanoví vhodnými validačními studiemi.

Metody a podmínky sterilizace

Sterilizace se může provést některou z dále popsaných metod. Jejich modifikace nebo kombinace se může použít za předpokladu, že vybraný postup se validuje jak s ohledem na jeho účinnost, tak i na neporušenost výrobku, včetně jeho obalu nebo balení.

U všech metod sterilizace se sledují kritické podmínky, aby se potvrdilo dosažení předem stanovených podmínek v celé šarži během celého sterilizačního postupu. To platí ve všech případech, včetně těch, kde se použily doporučené podmínky.

Sterilizace v konečném obalu

Pro sterilizaci v konečném obalu je nezbytné vzít v úvahu nehomogennost fyzikálních, případně chemických podmínek ve sterilizátoru. Místo ve sterilizátoru, které je pro sterilizační agens dostupné nejpozději, se stanoví jak pro každý způsob plnění, tak i pro různé velikosti a typy obalů nebo balení, např. nejchladnější místo v autoklávu. Minimální letalita daná sterilizačním cyklem a jeho reprodukovatelnost se také určí, aby se zajistilo, že všechny náplně shodně dostanou specifické ošetření.

Při zavedení sterilizace v konečném obalu je třeba získávat data o průběhu rutinního užití, kdekoliv je to možné, monitorováním a vhodným záznamem fyzikálních, případně chemických podmínek dosažených v náplni uvnitř sterilizátoru během každého sterilizačního cyklu.

Sterilizace parou (zahřívání v autoklávu). Sterilizaci nasycenou párou pod tlakem je třeba dát přednost všude, kde je to možné, obzvláště pro vodné přípravky. Pro tuto metodu sterilizace v konečném obalu jsou základními podmínkami pro vodné přípravky 15 min zahřívání na nejméně 121 C. Lze použít i jiné kombinace teploty a času za předpokladu, že bylo dostatečně prokázáno, že vybraný postup poskytne přiměřenou a reprodukovatelnou hladinu smrcení při rutinním používání se stanovenou tolerancí. Použité postupy a opatření jsou takové, aby se dosáhlo hladiny sterilizační jistoty 10^{-6} nebo lepší. Pokyny zabývající se validací pomocí F_o jsou poskytnuty dále (*5.1.5*).

Při sterilizaci se získávají znalosti o fyzikálních podmínkách (teplota a tlak) uvnitř autoklávu. Teplota se obvykle měří pomocí teplotních čidel umístěných v obalech zastupujících výrobek a v předem určeném nejchladnějším místě naplněného sterilizátoru. Podmínky se při každém cyklu vhodně zaznamenávají, např. jako teplotní graf nebo jinými vhodnými prostředky.

Kde se provádí biologické vyhodnocení, získává se pomocí vhodných biologických indikátorů (*5.1.2*).

Sterilizace suchým teplem. Pro tuto metodu sterilizace v konečném obalu jsou základními podmínkami nejméně 2 h při nejméně 160 C. Lze použít i jiné kombinace teploty a času za předpokladu, že bylo dostatečně prokázáno, že vybraný postup poskytne přiměřenou a reprodukovatelnou hladinu smrcení při rutinním používání se stanovenou tolerancí. Použité postupy a opatření jsou takové, aby se dosáhlo hladiny sterilizační jistoty 10^{-6} nebo lepší.

Tato sterilizace se provádí v horkovzdušných sterilizátorech vybavených nucenou cirkulací vzduchu nebo v podobných zařízeních vyvinutých speciálně pro tento účel. Sterilizátor se plní tak, aby v celé náplni byla dosažena stejná teplota. Teplota se obvykle měří pomocí teplotních čidel umístěných v obalech zastupujících výrobek a v předem určeném nejchladnějším místě naplněného sterilizátoru. Během celého cyklu se teplota vhodným způsobem zaznamenává.

Kde se provádí biologické vyhodnocení, získává se pomocí vhodných biologických indikátorů (*5.1.2*).

Suché teplo při teplotách vyšších než 220 °C se často používá ke sterilizaci a depyrogenizaci laboratorního skla. V tomto případě se může použít pokles o 3 log tepelně odolného endotoxinu místo biologických indikátorů (*5.1.2*).

Sterilizace ionizujícím zářením. Sterilizace touto metodou se dosáhne vystavením výrobku ionizujícímu záření ve formě gama-záření z vhodného zdroje (např. kobalt-60) nebo svazku elektronů o vysoké energii vycházejících z vhodného urychlovače elektronů.

V některých státech jsou směrnice, které stanoví pravidla pro použití ionizujícího záření ke sterilizačním účelům, např. v příslušných European Community Notes for Guidance.

Pro tuto metodu sterilizace v konečném obalu je doporučena absorbovaná dávka 25 kGy. Jiné dávky se mohou použít za předpokladu, že bylo dostatečně prokázáno, že vybraná dávka poskytne přiměřenou a reprodukovatelnou hladinu smrcení při rutinním používání se stanovenou tolerancí. Použité postupy a opatření jsou takové, aby se dosáhlo hladiny sterilizační jistoty 10^{-6} nebo lepší.

Při sterilizačním postupu se sleduje výrobkem absorbovaná dávka radiace za použití stanovených dozimetrických postupů, které jsou nezávislé na počtu dávek. Dozimetry se kalibrují standardními zdroji referenční radiace, které jsou dodávány s přístroji od výrobce. Intervaly kalibrace by neměly přesáhnout 1 rok.

Kde se provádí biologické vyhodnocení, získává se pomocí vhodných biologických indikátorů (*5.1.2*).

Sterilizace plynem. Tato metoda sterilizace se používá výhradně tam, kde není jiná vhodná alternativa. Je nezbytné zajistit, aby plyn a vlhkost dokonale pronikly do sterilizovaného materiálu, a dále zajistit odstranění plynu za podmínek předem stanovených tak, aby jakékoli zbytky plynu, případně jeho rozkladných produktů, ve sterilizovaném výrobku byly pod koncentrací, která by při používání výrobku mohla mít toxické účinky. Pokyny pro použití ethylenoxidu jsou uvedeny např. v příslušných European Community Notes for Guidance.

Kdekoliv je to možné, měří se a zaznamenává koncentrace plynu, relativní vlhkost, teplota a doba trvání postupu. Měření se provádí v místě, kde jsou nejpozději dosaženy sterilizační podmínky stanovené při validaci procesu.

Účinnost postupu použitého při každé sterilizované náplni se kontroluje vhodným biologickým indikátorem (*5.1.2*).

Přiměřený vzorek každé šarže se zkouší na sterilitu před uvolněním šarže (*2.6.1*).

Filtrace

Určité účinné látky a výrobky, které se nemohou sterilizovat v konečných obalech, se mohou podrobit filtračnímu postupu, který používá filtry typu, jenž prokázal uspokojivé výsledky při zátěžových zkouškách užívajících vhodné mikroorganismy, např. suspenze *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091, CIP 103020 nebo CCM 4623). Doporučuje se provést zátěž při koncentraci nejméně 10^7 jednotek vytvářejících kolonie/cm^2 účinné plochy filtru. Suspenze se připraví v živné půdě z hydrolyzátů sóji a kaseinu a po průchodu filtrem se asepticky odebere a inkubuje aerobně při 32 °C. Takové výrobky vyžadují zvláštní předběžná opatření. Výrobní postup a prostředí jsou navrženy tak, aby omezovaly mikrobiální kontaminaci, a pravidelně se podrobují příslušnému sledování. Výrobní zařízení, obaly a uzávěry, a kdekoli je to možné, také vstupní látky se podrobí vhodnému sterilizačnímu postupu. Doporučuje se provádět filtraci co nejblíže k místu plnění. Operace následující po filtraci se provádějí v aseptických podmínkách.

Roztoky se filtrují membránovými filtry zadržujícími bakterie. Jmenovitá velikost pórů těchto filtrů je 0,22 μm nebo menší nebo se použije jiný typ filtru, o němž je známo, že má odpovídající

vlastnost zachytávat bakterie. Vhodnými opatřeními se zabrání ztrátě roztoku způsobené absorpcí na filtr a také uvolňování kontaminant z filtru. Je třeba věnovat pozornost mikrobiální kontaminaci před filtrací, kapacitě filtru, velikosti šarže a době filtrace. Filtr se nepoužívá déle, než bylo schváleno při validaci kombinace filtru a dotyčného výrobku.

Neporušenost sestaveného sterilizačního filtru se před použitím ověří a po použití potvrdí provedením zkoušky vhodné pro typ použitého filtru a fázi zkoušení, např. bublinkovým testem, testem difuzního toku nebo testem tlakové ztráty.

Pro možná dodatečná rizika filtrační metody ve srovnání s ostatními sterilizačními postupy může být v případech, kde nelze zajistit nízkou mikrobiální kontaminaci jinými prostředky, vhodné použít předfiltraci filtrem zadržujícím bakterie.

Aseptická příprava

Cílem aseptického postupu je udržet sterilitu výrobku složeného ze součástí, z nichž každá byla sterilizována některou z výše popsaných metod. Toho se dosáhne použitím podmínek a zařízení určených k zábraně mikrobiální kontaminace. Aseptický postup může zahrnovat aseptické plnění výrobku do systémů obal-uzávěr, aseptické míchání složek následované aseptickým plněním a balením.

Pro udržení sterility složek a výrobků při výrobě je třeba věnovat zvláštní pozornost zejména:
- prostředí,
- personálu,
- kritickým povrchům,
- sterilizaci systému obal-uzávěr a postupům přepravy,
- maximální době uchovávání přípravku před rozplněním do konečných obalů.

Postup validace obsahuje vhodnou kontrolu všeho výše uvedeného a kontrola postupu se provádí pravidelně pomocí zkoušek, které postup napodobí a používají mikrobiologické pomnožovací půdy, které se potom inkubují a vyšetřují na mikrobní kontaminaci (zkoušky pomocí rozplněných půd). Navíc před uvolněním každé šarže jakéhokoli výrobku, sterilizované filtrací nebo též aseptickým zpracováním, se přiměřený počet vzorků přezkouší na sterilitu (*2.6.1*).

5.1.2 Biologické indikátory pro sterilizaci

Biologické indikátory jsou standardizované přípravky z vybraných mikroorganismů používané k ověření účinnosti sterilizačního postupu. Obvykle je tvoří populace bakteriálních spor umístěná na inertním nosiči, např. proužku filtračního papíru, krycím sklíčku nebo trubičce z plastu. Naočkovaný nosič je pokryt tak, aby byl chráněn před jakýmkoliv poškozením nebo kontaminací, přičemž sterilizační agens může vejít do styku s mikroorganismy. Suspenze spor může být též v zatavených ampulích. Biologické indikátory se připravují tak, aby se mohly uchovávat v určených podmínkách; je vyznačena doba exspirace.

Mikroorganismy téhož bakteriálního druhu, jako jsou bakterie používané v přípravě biologických indikátorů, se mohou očkovat přímo do tekutého výrobku, který se má sterilizovat, nebo do tekutého výrobku, který je mu podobný. V tomto případě se však prokáže, že tekutý výrobek nemá inhibiční účinek na použité spory, zvláště na jejich klíčení.

Biologický indikátor je charakterizován jménem použitého bakteriálního druhu, číslem kmene v původní sbírce, počtem živých spor na nosiči a hodnotou D. Hodnota D je hodnota sterilizačního parametru (doba trvání nebo absorbovaná dávka), která je zapotřebí ke snížení počtu živých organismů na 10 % původní hodnoty. To je významné jedině v dobře definovaných experimentálních podmínkách. Obsaženy jsou pouze deklarované mikroorganismy. Mohou se používat

biologické indikátory obsahující na jednom nosiči více než jeden bakteriální druh. Uvedou se informace o živné půdě a podmínkách inkubace.

Doporučuje se, aby indikátorové organismy byly umístěny na místa, o nichž se předpokládá nebo, kde je to možné, na nichž bylo dříve fyzikálním měřením zjištěno, že jsou méně přístupná sterilizačnímu agens. Po expozici sterilizačnímu agens se nosiče spor za použití aseptického postupu přenesou do živných půd tak, aby se předešlo jejich kontaminaci. Mohou se použít biologické indikátory, které obsahují ampulku s živnou půdou umístěnou přímo v obale chránícím naočkovaný nosič.

Výběr indikátorových mikroorganismů se provádí tak, že:

a) v porovnání s patogenními mikroorganismy a mikroorganismy, jež mohou výrobek potenciálně kontaminovat, je u zkušebního kmene velká rezistence k jednotlivým sterilizačním postupům,
b) zkušební kmen je nepatogenní,
c) zkušební kmen se snadno kultivuje.

Po inkubaci růst zkušebního mikroorganismu, který byl podroben sterilizačnímu postupu, prokazuje, že tento postup byl nedostatečný.

1. Sterilizace parou. Použití biologických indikátorů určených pro sterilizaci parou se doporučuje pro validaci sterilizačních cyklů. Doporučují se spory *Bacillus stearothermophilus* (např. ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157, CCM 4395 nebo CIP 52.81). Počet živých spor na nosiči přesahuje $5 \cdot 10^5$. Hodnota D při 121 °C přesahuje 1,5 min. Je ověřeno, že 6min expozice biologických indikátorů páře při (121 ± 1) °C nechává spory schopné oživení a že při 15min expozici biologického indikátoru páře při (121 ± 1) °C zkušební mikroorganismy nevyrostou.

2. Sterilizace suchým teplem. Pro přípravu biologických indikátorů se doporučují spory *Bacillus subtilis* (např. var. *niger* ATCC 9372, NCIMB 8058, CCM 4624 nebo CIP 77.18). Počet živých spor na nosiči přesahuje $1 \cdot 10^5$ a hodnota D je asi 5 min až 10 min. Suché teplo při teplotě vyšší než 220 °C se často používá ke sterilizaci a depyrogenizaci skleněných předmětů. V tomto případě se místo biologických indikátorů může k důkazu snížení o 3 log použít bakteriální endotoxin rezistentní na teplo.

3. Sterilizace ionizujícím zářením. K monitorování běžných operací se mohou použít biologické indikátory jako doplněk stanovení účinnosti zvolené dávky radiační energie, zvláště v případě sterilizace urychlenými elektrony. Doporučují se spory *Bacillus pumilus* (např. ATCC 27.142, NCTC 10327, NCIMB 10692, CCM 4625 nebo CIP 77.25). Počet živých spor na nosiči přesahuje $1 \cdot 10^7$. Hodnota D přesahuje 1,9 kGy. Je ověřeno, že zkušební mikroorganismy nevyrostou, jestliže byl biologický indikátor vystaven 25 kGy (minimální absorbovaná dávka).

4. Sterilizace plynem. Použití biologických indikátorů je nezbytné při všech postupech sterilizace plynem, jak pro validaci sterilizačního cyklu, tak pro běžné operace. Počet živých spor na nosiči přesahuje $5 \cdot 10^5$. Pro peroxid vodíku a kyselinu peroctovou se doporučují spory *Bacillus stearothermophilus* (např. ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157, CCM 4395 nebo CIP 52.81), pro ethylenoxid a formaldehyd se doporučují spory *Bacillus subtilis* (např. var. *niger* ATCC 9372, NCIMB 8058 CCM 4624 nebo CIP 77.18). Pro použité postupy jsou známy parametry rezistence: např. pro ethylenoxid přesahuje hodnota D 2,5 min pro zkušební cyklus zahrnující 600 mg/l ethylenoxidu při 54 °C a 60% relativní vlhkosti. Je ověřeno, že při výše popsaném cyklu nedojde k růstu zkušebních mikroorganismů, pokud byly biologické indikátory vystaveny 60min expozici. Pokud byla expozice indikátorů jen 15 min a teplota nižší (600 mg/l, 30 °C a 60% relativní vlhkost), zůstanou spory schopné oživení. Je důležité, aby biologický indikátor byl schopen zjistit, že vlhkost ve sterilizátoru ani ve sterilizovaném výrobku nedostačuje k zajištění inaktivace dehydrovaných mikroorganismů. Při 60min expozici indikátorů 600 mg/l ethylenoxidu při 54 °C bez zvlhčení zůstanou spory schopné oživení.

5.1.3 Účinnost protimikrobních konzervačních látek

Pokud léčivý přípravek nemá sám dostačující protimikrobní účinnost, může se, zvláště u přípravků obsahujících vodu, přidat protimikrobní konzervační látka, která za obvyklých podmínek skladování nebo užívání zamezí pomnožování mikrobiální kontaminace nebo ji omezí. Používá se zvláště u vícedávkových balení a chrání pacienta před infekcí a před poškozením způsobeným zkažením přípravku. Protimikrobní konzervaci nelze použít k nahrazení správné výrobní praxe.

Účinnost konzervační látky může být zvýšena nebo snížena účinnou látkou léčivého přípravku nebo jeho celkovým složením, případně jeho obalem nebo uzávěrem. Protimikrobní účinnost léčivého přípravku se stanoví v jeho konečném balení a v průběhu trvání jeho použitelnosti, aby se zjistilo, že se účinnost během uchovávání nenarušila. Toto zkoušení se má provádět na vzorcích odebraných z konečného obalu bezprostředně před zkoušením.

V průběhu vývoje léčivého přípravku se prokazuje, že protimikrobní účinnost přípravku jako takového anebo, pokud to je nutné, s přidáním vhodné konzervační látky nebo látek zajišťuje dostačující ochranu před nežádoucími účinky, jež mohou pocházet z mikrobiální kontaminace nebo z jejího pomnožení v průběhu uchovávání a používání přípravku.

Účinnost protimikrobního působení se prokazuje dále popsanou zkouškou, která není určena k užití pro běžné kontrolní účely.

Zkouška účinnosti protimikrobní konzervace

Podstatou zkoušky je naočkování vhodných mikroorganismů, pokud možno do léčivého přípravku v jeho konečném obalu, uchovávání naočkovaného přípravku při předepsané teplotě, odebírání vzorků z obalu v určených časových intervalech a stanovení počtu mikroorganismů ve vzorcích takto odebraných.

Konzervační vlastnosti přípravků jsou dostačující, jestliže při zkoušce za předepsané teploty a v předepsaných časech se počet mikroorganismů v naočkovaném přípravku významně sníží nebo nevzroste. Požadavky na pokles počtu mikroorganismů v závislosti na době se liší podle druhu přípravků a stupně požadované ochrany (viz tabulky 5.1.3-1 až 5.1.3-3).

Zkušební kmeny

Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, CCM 1961, CNCTC Ps 37/65
Staphylococcus aureus	ATCC 6538, NCTC 10788, NCIMB 9518,CIP 4.83, CCM 4516, CNCTC Mau 29/58
Candida albicans	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, CCM 8215, CNCTC 59/91
Aspergillus niger	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, CCM 8222

Zkoušky se provádějí s každým kmenem samostatně. Určené kmeny se doplňují, když je to vhodné, jinými kmeny nebo druhy, které mohou představovat pravděpodobné kontaminanty přípravku. Např. se doporučuje, aby pro všechny perorální přípravky byla použita *Escherichia coli* (ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, CCM 5417) a *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381, IP 2021.92, CCM 8224) pro perorální přípravky obsahující vyšší koncentrace cukru.

Příprava inokula

Ze sbírkových kultur se bakterie přeočkují na povrch živné půdy B (*2.6.12*) a houby na povrch živné půdy C bez přidání antibiotik (*2.6.12*). Bakterie se inkubují 18 h až 24 h při 30 °C až 35 °C, *C. albicans* 48 h při 20 °C až 25 °C a *A. niger* při 20 °C až 25 °C po dobu jednoho týdne nebo do dosažení dobré sporulace. Kmeny lze přeočkovávat po oživení dříve, než dosáhnou optimálního stavu, ale počet přeočkování má být omezen na minimum.

Narostlé kolonie bakterií a *C. albicans* se smyjí sterilním roztokem obsahujícím *chlorid sodný R* (9 g/l) a *pepton R* (1 g/l), převedou se do vhodné nádoby a stejným roztokem se naředí tak, aby obsahovaly 10^8 mikroorganismů v 1 ml. Kolonie *A. niger* se smyjí a naředí asi na 10^8 v 1 ml stejným způsobem za pomoci sterilního roztoku obsahujícího *chlorid sodný R* (9 g/l) a *polysorbát 80 R* (0,5 g/l).

Z každé suspenze se ihned odebere vzorek a stanoví se počty jednotek vytvářejících kolonie v 1 ml jednotlivé suspenze metodou stanovení počtu na pevných půdách nebo metodou membránové filtrace (*2.6.12*). Tato hodnota slouží ke stanovení velikosti inokula a je východiskem pro provedení zkoušky. Suspenze se použijí ihned po přípravě.

Postup zkoušky

Ke stanovení počtu živých mikrobů v naočkovaném přípravku se použije stejná živná půda jako při pomnožování příslušného mikroorganismu.

Naočkuje se série balení zkoušeného přípravku, každé balení suspenzí jednoho zkušebního kmene tak, aby v 1 g nebo v 1 ml přípravku bylo 10^5 až 10^6 mikroorganismů. Objem suspenze inokula nemá překročit 1 % objemu přípravku. Pečlivě se promísí, aby se dosáhlo stejnoměrného rozptýlení inokula.

Naočkovaný přípravek se uchovává při teplotě 20 °C až 25 °C, chráněn před světlem. Z každého obalu se odebírá vhodný vzorek, obvykle 1 g nebo 1 ml, a to ihned po naočkování a dále ve vhodných intervalech podle druhu přípravku a stanoví se počet živých zárodků metodou stanovení počtu na pevných půdách nebo metodou membránové filtrace (*2.6.12*). K odstranění zbytkové protimikrobní účinnosti se použije ředění, filtrace nebo specifická inaktivační látka. Použije-li se ředění, je třeba počítat se snížením citlivosti malého množství živých mikroorganismů. Použije-li se specifická inaktivační látka, je nutno ověřit přiměřenými kontrolami, zda je systém schopen umožnit růst testovacího kmene.

Postup se validuje ověřením jeho schopnosti dokázat požadované snížení počtu živých zárodků.

Požadavky

Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti jsou v tabulkách 5.1.3-1 až 5.1.3-3 vyjádřeny v logaritmickém snížení počtu živých zárodků proti hodnotám získaným pro čerstvě naočkované přípravky.

Tab 5.1.3-1 Parenterální a oftalmologické přípravky

		Logaritmické snížení počtu zárodků				
		6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
Bakterie	A	2	3	-	-	NR**
	B	-	1	3	-	NI*
Houby	A	-	-	2	-	NI
	B	-	-	-	1	NI

* NI = bez zvýšení počtu

** NR = bez nálezu

Požadavky v řádku A vyjadřují doporučenou účinnost, které má být dosaženo. V oprávněných případech, kdy tyto požadavky nemohou být splněny, např. pro zvýšené riziko nežádoucích účinků, uplatní se požadavky uvedené v řádku B.

Tab 5.1.3-2 Přípravky k místnímu použití

	Logaritmické snížení počtu zárodků			
	24 h	7 d	14 d	28 d
Bakterie A	2	3	-	NI
B	-	-	3	NI
Houby A	-	-	2	NI
B	-	-	1	NI

Požadavky v řádku A vyjadřují doporučenou účinnost, které má být dosaženo. V oprávněných případech, kdy tyto požadavky nemohou být splněny, např. pro zvýšené riziko nežádoucích účinků, uplatní se požadavky uvedené v řádku B.

Tab 5.1.3-3 Perorální přípravky

	Logaritmické snížení počtu zárodků	
	14 d	28 d
Bakterie	3	NI
Houby	1	NI

Výše uvedené požadavky vyjadřují doporučenou účinnost, které má být dosaženo.

5.1.4 Mikrobiologická jakost léčivých přípravků

Při výrobě, balení, skladování a distribuci léčivých přípravků se k zajištění jejich mikrobiologické jakosti použijí vhodné prostředky. Léčivé přípravky mají vyhovovat dále uvedeným požadavkům.

Kategorie 1

Přípravky, u nichž je v platném článku předepsána sterilita aplikační formy, nebo jiné přípravky, jež jsou označeny jako sterilní.
- Zkouška na sterilitu (*2.6.1*).

Kategorie 2

Přípravky k místnímu použití nebo k použití v dýchacím ústrojí s výjimkou přípravků, u nichž je předepsána sterilita.
- Celkový počet živých aerobů (*2.6.12*). Nejvýše 10^2 aerobních bakterií a hub v gramu nebo v mililitru.
- Nejvýše 10^1 enterobakterií a některých jiných gramnegativních bakterií v gramu nebo v mililitru (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Pseudomonas aeruginosa* (v 1,0 g nebo v 1,0 ml) (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Staphylococcus aureus* (v 1,0 g nebo v 1,0 ml) (*2.6.13*).

Kategorie 3

A. *Přípravky k perorálnímu a rektálnímu použití.*
- Celkový počet živých aerobů (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 aerobních bakterií a nejvýše 10^2 hub v gramu nebo v mililitru.
- Nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1,0 g nebo v 1,0 ml) (*2.6.13)*.

B. *Přípravky k perorálnímu podání obsahující suroviny přírodního živočišného, rostlinného nebo nerostného původu, které nelze protimikrobně ošetřit a pro něž oprávněná autorita připouští mikrobiologické znečištění suroviny překračující 10^3 živých mikroorganismů v gramu nebo v mililitru. Nevztahuje se na přípravky z rostlin popsané ve 4. kategorii.*
- Celkový počet živých aerobů (*2.6.12*). Nejvýše 10^4 aerobních bakterií a nejvýše 10^2 hub v gramu nebo v mililitru.
- Nejvýše 10^2 enterobakterií a některých jiných gramnegativních bakterií v gramu nebo v mililitru (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Salmonella* (v 10,0 g nebo v 10,0 ml) (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1,0 g nebo 1,0 ml) (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Staphylococcus aureus* (v 1,0 g nebo v 1,0 ml) (*2.6.13*).

Kategorie 4

Přípravky z rostlin sestávající jen z jedné nebo více rostlinných drog (celých, rozdrobněných nebo práškovaných).

A. *Přípravky z rostlin, k nimž se před použitím přidává vroucí voda.*
- Celkový počet živých aerobů (*2.6.12*). Nejvýše 10^7 aerobních bakterií a nejvýše 10^5 hub v gramu nebo v mililitru.
- Nejvýše 10^2 *Escherichia coli* v gramu nebo v mililitru (*2.6.13* za použití vhodného zředění).

B. *Přípravky z rostlin, k nimž se před použitím vroucí voda nepřidává.*
- Celkový počet živých aerobů (*2.6.12*). Nejvýše 10^5 aerobních bakterií a nejvýše 10^4 hub v gramu nebo v mililitru.
- Nejvýše 10^3 enterobakterií a některých jiných gramnegativních bakterií v gramu nebo v mililitru (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Escherichia coli* (v 1,0 g nebo v 1,0 ml) (*2.6.13*).
- Nepřítomnost *Salmonella* (v 10,0 g nebo v 10,0 ml) (*2.6.13*).

5.1.5 Používání pojmu F_0 při sterilizaci vodných přípravků parou

Tato část podává informace a návod, ale není závaznou částí lékopisu.

Hodnota F_0 sterilizačního postupu využívajícího nasycenou páru je letalita vyjádřená jako odpovídající čas v minutách při teplotě 121 °C ve vztahu k mikroorganismům majícím hodnotu $Z = 10$ při sterilizaci výrobku v jeho konečném obalu.

Celková hodnota F_0 postupu bere v úvahu všechny zahřívací a chladicí fáze cyklu a může se vypočítat integrací smrtících hodnot všech teplotních intervalů s ohledem na dobu jejich trvání.

Jestliže je cyklus sterilizace parou navržen na základě metody F_0, je nezbytné věnovat velkou pozornost přiměřenému jištění sterility. Navíc může být také nutné vedle validace postupu provádět při běžné výrobě trvalé a přísné mikrobiologické sledování tak, aby se prokázalo, že se mikrobiolo

gické parametry pohybují v rámci platných mezí s cílem dosáhnout hladinu sterilizační jistoty 10^{-6} nebo lepší.

V případě sterilizace parou se hodnota Z vztahuje k tepelné odolnosti mikroorganismu v závislosti na teplotě. Hodnota Z je změna teploty potřebná ke změně hodnoty D o faktor 10.

Hodnota D (decimální redukční hodnota) je hodnota parametru sterilizace (čas nebo absorbovaná dávka) potřebná ke snížení počtu živých organismů na 10 % původního počtu. Hodnota D má význam jedině při zachování přesně definovaných experimentálních podmínek.

Používají se následující matematické vztahy:

$$F_o = D_{121}(\log N_o - \log N) = LD_{121} \log IF ,$$

kde značí:

D_{121} - hodnotu D referenčních spor (*5.1.2*) při teplotě 121 °C,
N_o - počáteční počet živých mikroorganismů,
N - konečný počet živých mikroorganismů,
IF - inaktivační faktor.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} ,$$

kde značí:

D_1 - hodnotu D mikroorganismu při teplotě T_1,
D_2 - hodnotu D mikroorganismu při teplotě T_2.

$$IF = N_o - N = 10^{t/D} ,$$

kde značí:

t - dobu expozice,
D - hodnotu D mikroorganismu za podmínek expozice.

5.2 Dodatky k technologii vakcín

5.2.1 Terminologie použitá v článcích vakcín

V některých případech, obvykle ve spojitosti s veterinárními vakcínami, používané alternativní pojmy jsou uvedeny v závorce.

Systém jednotné inokulace - Seed lot system

Systém, podle něhož za sebou jdoucí šarže výrobku jsou odvozeny z jednoho matečného inokula. Pro běžnou výrobu se může z matečného inokula (master seed lot) připravit pracovní inokulum (working seed lot). U matečného i pracovního inokula je evidován původ a počet pasáží.

Matečné inokulum - Master seed lot

Kultura mikroorganismů pocházející z jedné várky, rozdělené do nádob, zpracovaných společně v jedné operaci takovým způsobem, aby se zajistila stejnorodost a stabilita a nedošlo ke kontaminaci. Matečné inokulum v tekuté formě se obvykle uchovává při teplotě -70 °C nebo nižší. Lyofilizované matečné inokulum se uchovává při takové teplotě, o které je známo, že zaručí stabilitu.

Pracovní inokulum - Working seed lot

Kultura mikroorganismů odvozená od matečného inokula a určená pro použití ve výrobě. Pracovní inokulum je rozděleno do nádob a skladuje se stejně, jak je předepsáno pro matečné inokulum.

Systém buněčných bank - Cell bank system (Cell-seed system)

Systém, kde za sebou jdoucí šarže výrobku jsou výráběny kultivací v buňkách, které jsou získány ze stejné banky základních buněk. Určitý počet nádob banky základních buněk se použije k přípravě banky pracovních buněk. Systém buněčných bank se validuje pro nejvyšší počet pasáží dosažený v průběhu běžné výroby.

Banka základních buněk - Master cell bank (Master cell seed)

Kultura buněk rozdělená do nádob v jedné operaci zpracovaná společně a uchovávaná tak, aby se zajistila stejnorodost a stabilita a nedošlo ke kontaminaci. Banka základních buněk se obvykle uchovává při teplotě -70 °C nebo nižší.

Banka pracovních buněk - Working cell bank (Working cell seed)

Kultura buněk pocházejících z banky základních buněk a určená k přípravě kultury produkčních buněk. Banka pracovních buněk je rozdělena do nádob, zpracována a uchovávána stejně, jak je předepsáno pro banku základních buněk.

Kultury primárních buněk - Primary cell cultures

Kultury buněk získaných pomocí trypsinu ze vhodné tkáně nebo orgánu. Buňky jsou v podstatě totožné s buňkami původní tkáně a jsou nejvýše v páté pasáži *in vitro* od původní přípravy ze živočišné tkáně.

Buněčné linie - Cell lines

Kultury buněk, které mají velkou schopnost pomnožování *in vitro*. V liniích diploidních buněk mají buňky v podstatě stejné charakteristiky s buňkami původní tkáně. U kontinuálních buněčných linií jsou buňky schopny se neomezeně množit v kultuře a mohou se získávat ze zdravé nebo nádorové tkáně. Za určitých podmínek mají některé kontinuální buněčné linie onkogenní schopnost.

Kultura produkčních buněk - Production cell culture

Kultura buněk určených k použití ve výrobě; může pocházet z jedné nebo více nádob banky pracovních buněk nebo to může být kultura primárních buněk.

Kontrolní buňky - Control cells

Množství buněk oddělených při očkování virem jako neinfikovaná buněčná kultura. Neinfikované buňky se inkubují v podobných podmínkách jako buňky použité v kultuře produkčních buněk.

Jednotlivá sklizeň - Single harvest

Materiál získaný jednorázově nebo opakovaně z jedné kultury produkčních buněk naočkovaných stejným pracovním inokulem nebo suspenzí odvozenou z tohoto inokula, inkubované a sklizené v jednom výrobním postupu.

Monovalentní spojená sklizeň - Monovalent pooled harvest

Smíšený materiál obsahující jeden kmen nebo typ mikroorganismu nebo antigenu. Odvozuje se z určitého počtu embryí nebo nádob s buněčnými kulturami, které jsou zpracovány ve stejnou dobu.

Konečná várka vakcíny - Final bulk vaccine

Materiál, který prošel všemi stupni výroby až na konečné rozplnění. Obsahuje jednu nebo více monovalentních spojených sklizní, z kultur jednoho nebo více druhů nebo typů mikroorganismů, po jejich vyčeření, zředění, přidání adjuvans nebo jiné pomocné látky. Je zpracován tak, aby se zajistila jeho homogenita, a použije se k rozplnění do nádob, jako jedna nebo více šarží.

Šarže - Final lot (Batch)

Soubor uzavřených konečných obalů nebo jiných konečných dávkovaných jednotek, u nichž se očekává, že jsou homogenní a rovnocené se zřetelem na riziko kontaminace při plnění nebo přípravě konečného přípravku. Dávkované jednotky se plní nebo se jinak připravují z téže konečné várky vakcíny, společně se lyofilizují (pokud to lze) a uzavírají v jedné nepřetržité pracovní směně. Mají rozlišovací číslo nebo kód identifikující šarži. Jestliže se konečná várka vakcíny plní, případně lyofilizuje v několika oddělených pracovních směnách, vzniká souvislý soubor šarží, které se obvykle identifikují použitím společné části rozlišovacího čísla nebo kódu. Tyto související šarže se někdy uvádějí jako subšarže nebo rozplňovaná partie.

Složená vakcína - Combine vaccine

Vícesložkový přípravek, který je sestaven tak, aby se různé antigeny podaly současně. Různé antigenní složky jsou zamýšleny k ochraně před různými kmeny či typy stejného organismu nebo též proti různým organismům. Složená vakcína se může výrobcem dodávat buď jako jeden tekutý nebo lyofilizovaný přípravek, nebo jako několik složek s pokyny ke smíchání před použitím.

5.2.2 Chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů, která jsou určena pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín

Kuřata, embrya nebo buněčné kultury použité ve výrobě nebo ke zkoušení jakosti vakcín pocházejí z vajec produkovaných chovy prostými specifikovaných patogenů (SPF), je-li to v článku uvedeno. Status chovu SPF se zajišťuje prostředky systému popsaného dále. Seznam daných mikroorganismů se zakládá na průběžných poznatcích a podle potřeby se aktualizuje.

Všeobecné principy a postupy

Chov je definován jako skupina ptáků sdílejících společné prostředí a majících vlastního chovatele, který nemá žádný styk s chovy, které nejsou SPF. Pokud se jednou určí chov jako SPF, nepřidá se k němu žádný pták, který není SPF.

U chovů SPF založených na obměňovaném základu se všechny výměny líhnou a odchovávají v místnosti s kontrolovaným prostředím. Schválení oprávněnou autoritou podléhá, zda se SPF embrya, získaná z kontrolovaného SPF chovu v jiné odchovně, mohou umístit na stejné stanoviště. Od stáří osmi týdnů jsou tito přemístění ptáci považováni za chov a měsíčně se sledují podle požadavků popsaných v článku Pozdější zkoušky. V době snášky se všichni přemístění ptáci zkoušejí podle požadavků uvedených v odstavci Úvodní zkoušky.

Chov se umísťuje tak, aby se snížilo riziko kontaminace. Neumísťuje se do blízkosti chovů ptáků, které nejsou SPF, ale umísťuje se a chová se v izolovaných prostorách nebo na roštech v odchovnách, jejichž vzduch se filtruje pod přetlakem. Dodržují se vhodná opatření proti přístupu hlodavců, divokého ptactva, hmyzu a nepovolaných osob.

Osoby oprávněné ke vstupu nesmějí přijít do styku s jinými ptáky nebo s agens, které by mohlo infikovat chov. Doporučuje se, aby se personál před vstupem do místnosti s kuřaty vysprchoval a převlékl, nebo aby nosil ochranný oděv.

Všechny věci, které se přinášejí do prostor chovu, se sterilizují. Vhodně se ošetří i krmivo, aby se předešlo zavlečení nežádoucích mikroorganismů, a voda se získává z chlorovaných zdrojů. Neprovádějí se žádná léčení, která by mohla překážet při zjišťování nemoci v chovu. Průběžně se zaznamenávají údaje o celkovém zdravotním stavu chovu a každá abnormalita se prošetřuje. Sledované faktory zahrnují morbiditu, mortalitu, obecnou fyzickou kondici, spotřebu krmiva, denní produkci vajec, jejich kvalitu, plodnost a líhnivost. Špinavá vejce se odstraní, povrch čistých vajec se ještě za tepla může dezinfikovat.

Chov pochází z kuřat prostých vertikálně přenosných zárodků, zvláště se opakovaně vyšetřuje každé kuře, z něhož se odvozuje chov, aby se zajistilo, že je prosto viru leukózy a protilátek proti ní. Statut SPF se může chovu přisoudit pouze tehdy, chová-li se v SPF podmínkách po zkušební dobu nejméně čtyři měsíce. Každý kus v chovu musí být prostý infekce vyvolané níže uvedenými zárodky podle odstavce Úvodní zkoušky. Po šesti týdnech a na konci zkušebního období se prokáže, že v celém chovu je každý pták prost příznaků infekce zárodky dále uvedenými v seznamu Úvodní zkoušky.

V každé nové generaci založeného chovu se všichni ptáci zkoušejí nejpozději ve stáří dvaceti týdnů. Používají se zkoušky uvedené v odstavci Úvodní zkoušky. Po úvodních zkouškách se každý měsíc provádějí u reprezentativního vzorku 5 % (nejméně u deseti a nejvýše u 200 ptáků). Přitom se používají zkoušky uvedené v odstavci Pozdější zkoušky. Poslední zkouška se provádí čtyři týdny po posledním sběru vajec.

Pro všechny zkoušky se odebírá krev vhodnému počtu ptáků ve specifikované době. Výsledné vzorky séra se zkoušejí na protilátky proti příslušným zárodkům. Sérumneutralizační zkoušky se provádějí ze směsných vzorků nejvýše pěti sér. Ostatní zkoušky se provádějí samostatně u každého vzorku séra. U všech zkoušek se používají pozitivní a negativní kontroly. Ve zkouškách se užívají reagencie, které jsou kalibrovány na mezinárodní nebo evropský standard, pokud existuje. Vedle těchto sérologických zkoušek na přítomnost protilátek se zkouší přiměřené množství vzorku na virus aviární leukózy.

Aby se potvrdila absence neštovic a příznaků jiných infekcí, provádí se nejméně jednou týdně kromě sérologických zkoušek i klinické vyšetření. U každého uhynulého kusu se provádí pitva, a je-li nutné potvrdit diagnózu, i histopatologické vyšetření, aby se ověřilo, že se nejedná o infekci. Nepřítomnost rodu *Salmonella* se stanovuje nejméně jedenkrát za 4 týdny kultivací vzorků trusu; může se použít směsný vzorek z nejvýše deseti kusů.

Pokud se u různých zkoušek získá pozitivní výsledek před udělením statutu SPF, nemůže se chov označit za SPF chov. Pokud se zjistí pozitivní výsledek v jakékoliv zkoušce u chovu, jemuž byl již statut SPF udělen, chov svůj status ztrácí. Speciální opatření se uplatňují na původce kuřecí

anémie (CAA), jak je dále popsáno. Všechna kuřata, embrya i buněčné kultury získané v období od posledního negativního výsledku jsou neupotřebitelné: všechny výrobky z nich se musí odstranit a všechny provedené zkoušky s tímto materiálem jsou neplatné a musí se opakovat.

K opětovnému získání statutu SPF se chov udržuje v SPF podmínkách a mimo každoměsíčního zkoušení každého ptáka z celého chovu na infekční agens, které bylo dříve pozitivní, pokračují rutinní zkoušky na 5 % chovu. Infikovaní ptáci a jejich potomci se odstraní z chovu. SPF statut je chovu opět přidělen, jestliže ve dvou z těchto po sobě jdoucích zkoušek byly dosaženy dva zcela negativní výsledky.

Pozitivní výsledek na CAA nevylučuje nutně použití materiálu získaného z tohoto chovu, ale živé vakcíny pro ptáky méně než 7 dnů staré musí být vyrobeny z materiálu z CAA-negativního chovu. Inaktivované vakcíny určené pro ptáky méně než 7 dnů staré mohou být vyrobeny z materiálu chovu, u kterého nebyla dokázána nepřítomnost CAA, pokud bylo dokázáno, že inaktivační proces inaktivuje CAA.

Nejméně 5 let se ukládají záznamy o úmrtnosti a výsledcích zkoušek. Podrobnosti o poklesu produkce vajec nebo líhnivosti, mimo případy nehod identifikovaných jako nehody neinfekčního původu a jakékoli jiné výsledky zkoušek indikující infekci specifikovaným agens, jsou ihned poskytnuty uživateli vajec.

Úvodní zkoušky

Užití jiných zkoušek, pokud jsou nejméně stejně citlivé a odpovídají specifitě jako zkoušky uvedené dále, podléhá schválení oprávněnou autoritou.

Mikroorganismus	**Druh zkoušky**
aviární adenoviry	ELISA
virus aviární encefalomyelitidy	ELISA
virus aviární infekční bronchitidy	ELISA
virus aviární infekční laryngotracheitidy	sérumneutralizace
virus aviární leukózy	ELISA-virus
sérumneutralizace protilátky	virus aviární nefritidy
fluorescenční protilátky	
aviární reoviry	ELISA
virus aviární retikuloendoteliózy	fluorescenční protilátky
anémie kuřat	fluorescenční protilátky
hemaglutinující aviární adenovirus (syndrom poklesu snášky 76 - EDS 76 virus)	HIT
virus infekční burzitidy	sérumneutralizační test proti každému séroty-pu vyskytujícímu se v zemi původu
virus influenzy A	ELISA
virus Markovy obrny	ELISA
virus Newcastleské choroby	HIT
virus rhinotracheitidy krůt	ELISA
Mycoplasma gallisepticum	aglutinace a pro potvrzení pozitivity HIT
Mycoplasma synoviae	aglutinace a pro potvrzení pozitivity HIT
Salmonella pullorum	aglutinace

Pozdější zkoušky

Užití jiných zkoušek, pokud jsou nejméně stejně citlivé a odpovídají specifitě jako zkoušky uvedené dále, podléhá schválení oprávněnou autoritou.

Mikroorganismus	**Druh zkoušky**
aviární adenoviry	ELISA
virus aviární encefalomyelitidy	ELISA
virus aviární infekční bronchitidy	ELISA
virus aviární infekční laryngotrachitidy	sérumneutralizace
virus aviární leukózy	ELISA na protilátky
virus aviární nefritidy	fluorescenční protilátky
aviární reoviry	fluorescenční protilátky
virus aviární retikuloendoteliózy	fluorescenční protilátky
anémie kuřat	fluorescenční protilátky
hemaglutinující aviární adenovirus	HIT
virus infekční burzitidy	imunodifuzní test proti každému sérotypu vyskytujícímu se v zemi původu
virus influenzy A	ELISA
virus Markovy obrny	ELISA
virus Newcastleské choroby	HIT
virus rhinotracheitidy krůt	ELISA
Mycoplasma gallisepticum	aglutinace a pro potvrzení pozitivity HIT
Mycoplasma synoviae	aglutinace a pro potvrzení pozitivity HIT
Salmonella pullorum	aglutinace

5.2.3 Humánní diploidní buňky pro výrobu humánních vakcín

Příprava vakcín na humánních diploidních buňkách je založena na systému buněčných bank. Raná populace diploidní buněčné kultury ve dvojnásobné hladině (výchozí buňky) je subkultivována na hladinu vyhovující vytvoření pracovních buněk.

Výchozí buňky. Výchozí buňky, z nichž se odvozují pracovní buňky, jsou charakterizovány se zřetelem na genealogii, totožnost (izoenzymy, sérologie, peptidové mapy nukleových kyselin), genetické markery (HLA), karyotyp (viz níže v odstavci Chromozomální charakteristika), růstové vlastnosti, virovou vnímavost, životaschopnost během uchovávání a konečnou dobu života.

Pozdní pasáž (v produkční zralosti nebo po ní) buněčného kmene se zkouší na nepřítomnost tumorogenity, na totožnost a normální karyotyp.

Pracovní buňky. Pracovní buňky jsou charakterizovány se zřetelem na totožnost a karyotyp (viz níže v odstavci Chromozomální monitorování). Zkouškami uvedenými dále se prokáže, že neobsahují bakteriální, plísňové ani mykoplazmatické kontaminace, a pomocí zkoušek na zvířatech, vejcích a v buněčných kulturách, že neobsahují cizorodá agens. Ve zvláštních případech mohou být nezbytné další vhodné testy.

Produkční buňky. Každá produkční buněčná kultura se skládá z pasáže na úrovni dvoutřetinové doby života daného buněčného kmene a zkouší se na totožnost pomocí markerů, jako např. izoenzymů, HLA nebo karyotyp od nejméně jedné metafáze rozvinutí chromozomů. Další zkoušky produčních buněk jsou popsány ve stati *2.6.16*.

Zkoušky na čistotu

Zkoušky na zvířatech a vejcích. Intramuskulárně (nebo v případě sajících myší injekcí do hlubokého podkoží) se každé z následujících skupin zvířat vstříkne nejméně 10^7 živých buněk rozdělených rovnoměrně mezi zvířata ve skupině:

a) dvou vrhů novorozených myší mladších 24 h po nejméně 10 zvířatech,
b) 10 dospělých myší,
c) 5 morčat,
d) 5 králíků.

Zvířata se pozorují nejméně 4 týdny. U zvířat, která onemocní nebo vykazují jakoukoliv abnormalitu, se zjistí příčina nemoci. Neprokáže se žádné cizorodé agens. Zkoušku lze hodnotit pouze tehdy, když nejméně 80 % zvířat v každé skupině je zdravých a přežije do konce pozorovací doby.

Nejméně 10^6 živých buněk se vstříkne do alantoidní dutiny deseti kuřecích embryí 9 až 11 dní starých. Inkubují se 3 dny a alantoidní tekutina se zkouší na přítomnost hemaglutininů na morčecích, kuřecích nebo jiných ptačích červených krvinkách. Neprokáže se žádné cizorodé agens. Zkoušku lze hodnotit pouze tehdy, když nejméně 80 % embryí je zdravých a přežije do konce pozorovací doby.

Tumorogenita. Vhodnými zkouškami se prokáže nepřítomnost tumorogenity u buněk v produkční úrovni nebo po ní. Buňky kmene MRC-5 a WI-38 jsou uznány na netumorogenní a další zkoušení není u nich nutné.

Chromozomální charakteristika. Zkoušejí se nejméně čtyři vzorky, každý sestávající z 1000 buněk v metafázi, v přibližně stejných intervalech během délky života buněčné linie při sériové kultivaci buněčných linií. Zkoumá se frekvence polyploidie, přesný počet chromozomů, frekvence zlomů, strukturální abnormality a ostatní abnormality, jako je despiralizace nebo patrné zúžení primární a sekundární konstrikce. Všechny buňky vykazující abnormality se podrobí detailnímu hodnocení a záznamy se uvádějí podle podrobných kritérií vztažených k určitým abnormalitám zjištěným při analýze karyotypu[1)]. Trvalé obarvené preparáty nebo jejich fotografie jsou uchovávány jako součást záznamů pro každou šarži vakcíny.

Chromozomální monitorování. Zkoumá se nejméně 500 buněk v metafázi v produkční úrovni nebo v následující pasáži. Provede se zkoušení pro tytéž ukazatele a stejným způsobem, jak bylo popsáno výše. Pouze buňky, které mají normální karyotypy, se mohou použít k výrobě vakcíny.

Bakterie a houby. 10 ml vzorku vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Mykoplazmata (*2.6.7*) 10 ml vzorku vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Mykobakterie (*2.6.2*). 5 ml vzorku se zkouší na nepřítomnost *Mycobacterium* spp. kultivační metodou citlivou pro detekci těchto organismů.

[1)] Světová zdravotnická organizace doporučuje následující kritéria aplikovaná na buňky MRC-5 a WI-38: Pro buňky zkoumané v metafázi jsou pro abnormality následující vyšší limity (větší limit spolehlivosti (P = 0,95) (Poisson):

abnormality	1000 buněk	500 buněk
zlomy chromatidů a chromozomů	47/1000	26/500
strukturální abnormality	17/1000	10/500
hyperploidie	8/1000	5/500
hypoploidie	180/1000	90/500
polyploidie	30/1000	17/500

Zkouška na cizorodá agens v buněčných kulturách. Vzorek vyhovuje zkoušce na hemadsorbující viry a zkouškám na cizí antigeny v buněčných kulturách uvedeným v odstavci Kultura produkčních buněk (*2.6.16* Důkaz cizích antigenů v humánních virových vakcínách).

5.2.4 Buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín

Buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín vyhovují požadavkům této části. Bude možná také nutné, aby buněčné kultury pro účely zkoušení veterinárních vakcín vyhověly některým nebo všem těmto požadavkům.

Většina savčích virů může růst v buněčných liniích, a proto není užití primárních buněk přijatelné.

Permanentně infikované buňky použité k výrobě veterinárních vakcín vyhovují vhodným požadavkům popsaným níže. Prokáže se, že buňky jsou infikovány pouze deklarovaným agens.

Buněčné linie

Buněčné linie se běžně kultivují systémem buněčného inokula. Každá banka základních buněk má přidělen specifický kód k identifikačním účelům. Buňky základní banky se skladují v dávkách při teplotě -70 °C nebo nižší. Výroba vakcín se obvykle provádí z buněk základní banky, které neprošly více než dvaceti pasážemi.

Jsou-li použity suspenzní kultury, u kterých zvýšení počtu buněk odpovídá přibližně třem zdvojeným populacím, považuje se to za jednu pasáž. Jestliže se k výrobě mají použít buňky, které byly pasážovány více než dvacetkrát, mělo by se prokázat validací nebo dalšími zkouškami, že produkční buněčné kultury v podstatě jsou shodné s buňkami banky základních buněk, pokud se týká biologického charakteru a čistoty, a že použití těchto buněk nemá škodlivý vliv na výrobu vakcíny. Vývoj buněčných linií má být znám a podrobně zapsán (např. původ, počet pasáží, média užitá pro pomnožení, podmínky uchovávání).

Zapisuje se metoda uchovávání a užití buněk, včetně podrobností, jak bylo zajištěno, že ve výrobě nebude překročen maximální povolený počet pasáží. Dostatečné množství buněk základní banky a buněk z každé pracovní banky se uchovává pro analytické účely.

Zkoušky popsané dále se provádějí (jak je předepsáno v tabulce 5.2.4-1) na kulturách banky základních buněk a pracovních buněk nebo na buněčných kulturách z banky pracovních buněk v nejvyšší pasáži, která je použita ve výrobě a je odvozena z homogenního vzorku, o němž bylo prokázáno, že je reprezentativní.

Charakteristika buněčných kultur. Popíše se vzhled buněčných monolayerů před a po histologickém obarvení. Podle možností se získají číselné údaje o rychlosti a úrovni růstu. Podobně se specifikuje přítomnost nebo nepřítomnost kontaktní inhibice, polynukleárních buněk a jakýchkoliv jiných buněčných abnormalit.

Tab 5.2.4-1 Stadia buněčných kultur, na nichž se provádějí zkoušky

	Banka základních buněk	Banka pracovních buněk	Buňky pracovní banky v nejvyšším stupni pasáže
všeobecná mikroskopie	+	+	+
bakterie a houby	+	+	-
mykoplazmata	+	+	-
viry	+	+	-
identifikace druhu	+	-	+
karyotyp	+	-	+
tumorogenita	+	-	-

Karyotyp. Vyšetření chromozomů se provede u nejméně padesáti buněk v probíhající mitóze u banky základních buněk a v minimálně takové úrovni pasáže, která bude použita ve výrobě. Jakýkoliv chromozomální znak přítomný u banky základních buněk se také najde ve vysoce pasážovaných buňkách. Způsobové číslo chromozomů těchto buněk není o více než o 15 % vyšší než hodnoty banky základních buněk. Karyotypy jsou totožné. Jestliže způsobové číslo překročí danou hodnotu nebo jestliže nejsou u banky pracovních buněk v nejvyšší pasáži užité pro výrobu nalezeny chromozomální znaky nebo se liší karyotyp, tyto buněčné linie se nemohou použít ve výrobě.

Identifikace druhu. Validovanou metodou se prokáže, že banka základních buněk a buňky pracovní banky v nejvyšším stupni pasáže užívané k výrobě patří k druhu specifikovaného původu. Jestliže se provede fluorescenční zkouška pomocí séra proti druhu, z něhož buňky pocházejí, a prokáže se, že všechny zkoušené buňky fluoreskují, není dále nutné provádět další zkoušky se zkoumadly, která mohou prokázat kontaminaci buňkami jiných druhů.

Bakterie a houby. Buňky vyhovují zkoušce na sterilitu (*2.6.1*). Vzorek zkoušených buněk není menší než množství buněk v monolayeru o ploše 70 cm^2 nebo u buněk kultivovaných v suspenzích přibližně srovnatelný počet. Před zahájením zkoušky se buňky nejméně 15 dnů udržují v kultuře bez antibiotik.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Buňky vyhovují zkoušce na mykoplazmata. Před zahájením zkoušky se buňky nejméně 15 dnů udržují v kultuře bez antibiotik.

Nepřítomnost kontaminujících virů. Zjišťuje se, zda buňky nejsou kontaminovány viry, a proto se provádějí vhodně citlivé zkoušky včetně těch, které jsou popsány dále.

U monolayerů se zkouší plocha nejméně 70 cm^2. Monolayer se připraví a udržuje pomocí médií a aditiv v podmínkách podobných podmínkám při výrobě vakcín. Kultury monolayerů se udržují po dobu nejméně celkem 28 dnů. Subkultury se zakládají každých 7 dnů. Pokud buňky nejsou schopné přežít tuto dobu, subkultura se zakládá v nejzazším možném termínu. Z dostatečného počtu buněk, které jsou uloženy ve vhodných nádobách, se připraví konečná subkultura pro zkoušky popsané dále.

Monolayery se po dobu inkubace pravidelně prohlížejí na možnou přítomnost cytopatických efektů. Na konci pozorovací doby na zjištění cytopatických efektů se zkouší na přítomnost hemadsorpčních virů a specifické viry se prokazují imunofluorescencí nebo jinými vhodnými zkouškami, které jsou popsány dále.

Detekce cytopatických virů. Dva monolayery o plochách nejméně 6 cm^2 se obarví vhodným cytologickým barvivem. Celá oblast každého obarveného monolayeru se prohlédne a zjišťuje se přítom-

nost inkluzních tělísek, abnormálního počtu obřích buněk a dalších buněčných abnormalit, které mohou souviset s kontaminací.

Detekce hemadsorpčních virů. Monolayery o ploše nejméně 70 cm^2 se několikrát promyjí vhodným tlumivým roztokem a přidá se dostatečný objem suspenze vhodných erytrocytů tak, aby povrch monolayerů byl rovnoměrně pokryt. Po různých dobách inkubace se buňky prohlížejí na přítomnost hemadsorpce.

Detekce specifikovaných virů. Provedou se zkoušky na nepřítomnost specifických kontaminant druhu, z něhož pochází buněčná linie, a druhu, jemuž je výrobek určen. Na vhodných podkladech se připraví dostatečné množství buněk k provedení zkoušek na specifikované agens. Všechny zkoušky se doplní patřičnými pozitivními kontrolami. Buňky se podrobí vhodným zkouškám, jako např. užití fluorescenčně-konjugovaných protilátek nebo podobných zkoumadel.

Zkouška na jiné buněčné kultury. Ke zkoušce se použijí monolayery o ploše nejméně 140 cm^2. Buňky se nejméně třikrát zmrazí a rozmrazí, potom se odstředí, aby se odstranily odumřelé buňky. Inokuluje se alikvotní podíl do kultur následujících buněk, dříve než dojde k 70% nárůstu:
- primárních buněk druhu, který je zdrojem,
- buněk citlivých na viry patogenní pro druh, pro který je vakcína určena,
- buněk citlivých na pestiviry.

Inokulované buňky se udržují v kultuře nejméně 7 dnů, potom se zmrazí a rozmrazí, připraví se výtažky, jak je uvedeno výše, a inokulují do patřičných čerstvých kultur stejných typů buněk, které umožňují zkoušení, jaké je popsané níže. Buňky se inkubují nejméně 7 dalších dnů. Kultury se pravidelně prohlížejí na přítomnost cytopatických změn indikujících živé organismy.

Za 14 dní se inokulované buňky zkoušejí na:
- nepřítomnost cytopatických a hemadsorpčních organismů, při použití metod popsaných v příslušném odstavci výše,
- nepřítomnost pestivirů a jiných specifických kontaminant imunofluorescencí nebo jinou validovanou metodou, jak je uvedeno výše v odstavci Detekce specifikovaných virů.

Tumorogenita. Zváží se riziko buněčných linií pro cílový druh, a je-li třeba, provedou se zkoušky.

Primární buňky

Pro většinu savčích vakcín není použití primárních buněk při výrobě vakcín přijatelné, neboť mohou být použity buněčné linie. Pokud není možná žádná jiná alternativa, mohou být použity primární buňky, které pocházejí ze stáda nebo hejna prostého specifikovaných patogenů s kompletní ochranou proti zavlečení chorob (např. bariéry zabraňující šíření chorob, filtrace vzduchu, vhodná karanténa před zavedením zvířat). Kuřecí chovy vyhovují požadavkům uvedeným ve stati Chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů, která jsou určena pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín (*5.2.2*). Pro všechny ostatní druhy se prokazuje, že ve stádě nebo hejnu není přítomen závažný specifikovaný patogen. Každý takový chov, který je určen pro výrobu primárních buněk určených k výrobě vakcín, je podroben vhodnému monitorování, které zahrnuje i pravidelné sérologické kontroly, které jsou prováděny nejméně dvakrát za rok, a dva dodatkové sérologické testy, které se provádí na 15 % chovu mezi dvěma kontrolami uvedenými výše.

Všude, kde je možné, zvláště u savčích buněk, se používá systém jednotné inokulace, např: banka základních buněk je založena po méně než pěti pasážích, výrobní buněčné inokulum neobsahuje buňky, které jsou více než pětkrát pasážovány z původní připravené buněčné suspenze, která pochází z živočišné tkáně.

Každá banka základních buněk, banka pracovních buněk a buňky v nejvyšší pasáži primárních buněk se kontrolují podle tabulky 5.2.4-2 dále popsanými metodami. Zkoušený vzorek zahrne všechny zdroje buněk použité pro výrobu šarže. Žádná šarže vakcíny vyrobené za pomoci buněk se neuvolní do oběhu, jestliže jedna ze zkoušek byla nevyhovující.

Tab 5.2.4-2 Stadia buněčných kultur ve vztahu k prováděným zkouškám

	Matečné buněčné inokulum	Pracovní buněčné inokulum	Buňky v nejvyšším stupni pasážování
všeobecná mikroskopie	+	+	+
bakterie a houby	+	+	-
mykoplazmata	+	+	-
viry	+	+	-
určení druhu	+	-	-

Charakteristika buněčných kultur. Popíše se vzhled buněčných monolayerů před a po histologickém obarvení. Zaznamenají se informace, dle možností číselné údaje, zvláště o rychlosti a úrovni růstu. Podobně se specifikuje přítomnost nebo nepřítomnost kontaktní inhibice, polynukleárních buněk a jakýchkoliv jiných buněčných abnormalit.

Určení druhu. Jednou validovanou zkouškou se prokáže, že banka základních buněk pochází ze specifikovaného původního druhu. Jestliže se provede fluorescenční zkouška pomocí séra proti druhu, z něhož buňky pocházejí, a prokáže se, že všechny zkoušené buňky fluoreskují, není dále nutné provádět další zkoušky se zkoumadly, které mohou prokázat kontaminaci buňkami jiných druhů.

Bakterie a houby. Buňky vyhovují zkoušce na sterilitu (*2.6.1*). Vzorek zkoušených buněk je nejméně množství buněk v monolayeru o ploše 70 cm^2, nebo u buněk kultivovaných v suspenzích přibližně srovnatelný počet. Před zahájením zkoušky se buňky nejméně 15 dnů udržují v kultuře bez antibiotik.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Buňky vyhovují zkoušce na mykoplazmata. Před zahájením zkoušky se buňky nejméně 15 dnů udržují v kultuře bez antibiotik.

Nepřítomnost kontaminujících virů. Zjišťuje se, zda buňky nejsou kontaminovány viry, a proto se provádějí vhodné citlivé zkoušky včetně těch, které jsou popsány dále.

U monolayerů se zkouší plocha nejméně 70 cm^2. Monolayer se připraví a udržuje pomocí médií a aditiv v podmínkách podobných podmínkám při výrobě vakcíny. Kultury monolayerů se udržují po dobu nejméně celkem 28 dnů nebo se kultivují co nejdelší možnou dobu, pokud kulturu nelze 28 dnů udržet. Subkultury se zakládají každých 7 dnů. Pokud buňky nejsou schopné přežít tuto dobu, subkultura se zakládá v nejzazším možném termínu.

Z dostatečného počtu buněk, které jsou uloženy ve vhodných nádobách, se připraví konečná subkultura pro zkoušky popsané dále.

Monolayery se po dobu inkubace pravidelně prohlížejí na možnou přítomnost cytopatických efektů. Na konci pozorovací doby na zjištění cytopatických efektů se zkouší na přítomnost hemadsorpčních virů a specifické viry se prokazují imunofluorescencí nebo jinými vhodnými zkouškami, které jsou popsány dále.

Detekce cytopatických virů. Dva monolayery o plochách nejméně 6 cm^2 se obarví vhodným cytologickým barvivem. Celá oblast každého obarveného monolayeru se prohlédne a zjišťuje se přítomnost inkluzních tělísek, abnormálního počtu obřích buněk a dalších buněčných abnormalit, které mohou souviset s kontaminací.

Detekce hemadsorpčních virů. Monolayery o ploše nejméně 70 cm^2 se několikrát promyjí vhodným tlumivým roztokem a přidá se dostatečný objem suspenze vhodných erytrocytů tak, aby povrch monolayerů byl rovnoměrně pokryt. Po různých dobách inkubace se buňky prohlížejí na přítomnost hemadsorpce.

Detekce specifikovaných virů. Provedou se zkoušky na nepřítomnost specifických kontaminant druhu, z něhož pochází buněčná linie, a druhu, jemuž je výrobek určen. Na vhodných podkladech se připraví dostatečné množství buněk k provedení zkoušek na specifikované agens. Všechny zkoušky se doplní patřičnými pozitivními kontrolami. Buňky se podrobí vhodným zkouškám, např. užití fluorescenčních-konjugovaných protilátek nebo podobných reagencií.

Zkouška na jiné buněčné kultury. Ke zkoušce se použijí monolayery o ploše nejméně 140 cm^2. Buňky se nejméně třikrát zmrazí a rozmrazí, potom se odstředí, aby se odstranily odumřelé buňky. Inokuluje se alikvotní podíl do kultur následujících buněk, dříve než dojde k 70% nárůstu:
- primárních buněk druhu, který je zdrojem,
- buněk citlivých na viry patogenní pro druh, pro který je vakcína určena,
- buněk citlivých na pestiviry.

Inokulované buňky se udržují v kultuře nejméně 7 dnů, potom se zmrazí a rozmrazí, připraví se výtažky, jak je uvedeno výše, a inokulují na dostatečné čerstvé kultury stejných typů buněk, které umožňují zkoušení, jak je popsáno dále. Buňky se inkubují nejméně dalších 7 dnů. Kultury se pravidelně prohlížejí na přítomnost cytopatických změn indikujících živé organismy.

Za 14 dní se inokulované buňky zkoušejí na:
- nepřítomnost cytopatických a hemadsorpčních organismů, při použití metod popsaných v příslušném odstavci výše,
- důležité substráty se zkoušejí na nepřítomnost pestivirů a jiných specifických kontaminant imunofluorescencí nebo jinou validovanou metodou, jak je uvedeno výše v odstavci Detekce specifikovaných virů.

5.2.5 Látky živočišného původu pro výrobu veterinárních vakcín

Látky živočišného původu (např. sérum, trypsin, sérový albumin) se mohou použít během výroby veterinárních imunologických přípravků jako součásti kultivačních médií ap. nebo jako části vakcín nebo rozpouštědel. Doporučuje se omezit dle možností užití těchto látek.

K použití těchto látek se vážou určitá omezení, která snižují riziko spojené s možnou přítomností patogenů v těchto látkách.
- Použití látek živočišného původu jako částí vakcín nebo rozpouštědel není všeobecně přijatelné s výjimku toho, kdy jsou tyto látky sterilizovány vhodnou validovanou metodou. Pokud je použití těchto látek prokazatelně podstatné a sterilizace není možná, platí kritéria popsaná pod Požadavky.
- Látky živočišného původu používané ve výrobě jsou buďto vystaveny vhodnému a validovanému sterilizačnímu nebo inaktivačnímu postupu, nebo se látka zkouší na nepřítomnost cizích organismů v souladu s Požadavky dále uvedenými. U inaktivovaných vakcín je metoda inaktivace vakcinačního kmene také validována na inaktivaci případných kontaminant z látek živočišného původu.

Kromě omezení dále popsaných zvažuje výrobce omezení při zacházení s látkami živočišného původu v budovách na výrobu vakcíny.

Omezení uložená těmito odstavci mohou být změněna vzhledem ke změnám ve výskytu nemocí v zemi původu a v Evropě.

Požadavky

Látky živočišného původu vyhovují požadavkům lékopisu (pokud je vypracován odpovídající článek).

Zdroj. Pečlivě se zváží riziko spojené s nemocemi zvířat vyskytujícími se v zemi původu látky a možný výskyt infekční nemoci u druhu, který je zdrojem, ve vztahu k zamýšlenému druhu příjemce. Použijí se nejpřísnější možná výběrová kritéria, zejména pro látky použité ve výrobku určeném pro stejný druh a pro látky hovězího, kozího, ovčího a prasečího původu.

Příprava. Látky živočišného původu se připravují z homogenního celkového objemu označeného číslem šarže. Šarže může obsahovat látky z tolika zvířat, kolik je potřeba. K jednou definované a číslem označené šarži se však nic nepřidává a nijak se nekontaminuje.

Prokáže se, že všechny šarže látek jsou prosty kontaminant, jak je popsáno níže, a případně se též provede validovaný inaktivační postup.

Inaktivace. Vybraný inaktivační postup by měl být prokazatelně schopen snížit titr určitých případných kontaminant v uvažované látce o nejméně 10^6. Jestliže se nemůže experimentálně prokázat toto snížení titru, provedou se studie kinetiky inaktivačního postupu a prokáže se, že je dostatečný vzhledem k možné úrovni kontaminace.

Uvede se seznam možných kontaminujících organismů, které je tento postup schopen prokazatelně inaktivovat s přihlédnutím k jednotlivým druhům původu látky. Důkaz o účinnosti postupu, který se vztahuje na běžné okolnosti, může být vzat z údajů uveřejněných v literatuře nebo z experimentálních výsledků vytvořených výrobcem.

Zkoušky na čistotu. Pro zkoušení látky na nepřítomnost kontaminant se pevná látka rozpustí nebo suspenduje ve vhodné tekutině tak, aby vznikl roztok nebo suspenze obsahující nejméně 300 g/l zkoušené látky. Je-li látka nerozpustná nebo když se zjistí cytotoxické reakce, může se použít nižší koncentrace.

Je-li v šarži látky nalezen jakýkoliv živý organismus, je tato šarže nevyhovující, látka se vyřadí nebo se přepracuje a prokáže se, že je vyhovující.

Nepřítomnost cizích virů. Roztok nebo suspenze pevné látky nebo neředěné tekuté látky se zkouší vhodnými citlivými metodami na přítomnost kontaminant. Tyto metody zahrnují zkoušky na vhodných citlivých buněčných kulturách, včetně primárních buněk z téhož druhu jako zkoušená látka. Část buněk se pasážuje nejméně dvakrát.

Buňky se 21 dní pravidelně prohlížejí na cytopatické efekty. Na konci každých 7 dnů se část buněk z původní kultury fixuje, obarví a prohlíží na cytopatické efekty, část se zkouší na hemadsorpci a část se podrobí vhodným sérodiagnostickým zkouškám na specifická agens.

Kontaminace bakteriemi a houbami. Před použitím se látky zkoušejí na sterilitu (*2.6.1*) a na nepřítomnost mykoplazmat (*2.6.7*) nebo se sterilizují, aby se inaktivovala jakákoliv kontaminace bakteriemi, houbami nebo mykoplazmaty.

5.2.6 Hodnocení bezpečnosti veterinárních vakcín

Při vývoji vakcíny se provádějí bezpečnostní zkoušky na cílovém druhu, aby se ukázalo riziko při používání vakcíny. Živé vakcíny se připravují jen z těch kmenů organismů, u nichž bylo prokázáno, že jsou bezpečné.

V zkouškách znamená "dávka" množství látky doporučené pro použití a obsahující nejvyšší titr nebo účinnost obsaženou ve výrobní šarži. U živých vakcín se pro zkoušky použije jedna nebo více šarží vakcíny připravené z nejméně atenuovaných pasáží použitých k výrobě.

U složených vakcín se prokáže bezpečnost jednotlivých složek i bezpečnost složeného výrobku. U inaktivovaných vakcín se zkoušky bezpečnosti provedené na složené vakcíně mohou považovat za dostatečné k prokázání bezpečnosti jednotlivých složek.

Dále popsané zkoušky, modifikované nebo doplněné zkouškami popsanými v jednotlivých lékopisných článcích v odstavci o výrobě, se mohou provést k dokázání bezpečnosti vakcíny jako část zkoušek nutných při jejím vývoji.

A. Laboratorní zkoušky

Bezpečnost podání jedné dávky. Pro každý z doporučených způsobů podání se aplikuje jedna dávka vakcíny citlivému zvířeti každého druhu a kategorie, pro které se použití vakcíny doporučuje. Zahrnuje to zvířata nejnižšího doporučeného věku a případně i gravidní zvířata. Zvířata se pozorují a zjišťují se známky abnormálních místních a systémových reakcí. Kde je to vhodné, obsahují tyto studie podrobné postmortální makroskopické a mikroskopické vyšetření místa vpichu; tyto studie není nutno provádět u nepotravinových zvířat. Zapisují se další objektivní kritéria, jako rektální teploty (u savců) a další měření. Rektální teploty se zapisují nejméně den před vakcinací, v době vakcinace, 4 h po ní a následující 4 dny. Zvířata se pozorují a vyšetřují tak dlouho, dokud jsou očekávány vedlejší reakce, ale ve všech případech se tato zvířata pozorují a vyšetřují po dobu nejméně 14 dnů po podání vakcíny.

Jako součást těchto studií je také zvážení kontroly reprodukční činnosti, když údaje naznačují, že výchozí materiál, ze kterého je vakcína vyrobena, může být rizikovým faktorem. Kde je to předepsáno v článku, vyšetří se schopnost reprodukce u samců, negravidních a gravidních samic, škodlivé vlivy na plod, včetně teratogenních a abortivních účinků.

Bezpečnost při předávkování. Nadlimitní dávka přípravku se podá každým z doporučených způsobů podání nejcitlivějším kategoriím zvířat cílového druhu, včetně zvířat nejmladších nebo gravidních, pokud je to vhodné. Nadlimitní dávka obyčejně obsahuje 10 dávek živé vakcíny nebo 2 dávky inaktivovaného přípravku. Tato zvířata se pozorují a vyšetřují na příznaky místních a systémových reakcí. Zapisují se další objektivní kritéria, jako jsou rektální teploty (u savců) a výsledky dalších měření. Zvířata se pozorují a vyšetřují nejméně 14 dnů po podání vakcíny.

Bezpečnost při opakovaném podání jedné dávky. Opakované podání jedné dávky se může požadovat k odhalení nežádoucích účinků vyvolaných tímto podáním. Zkoušení se provádí na nejvíce citlivých kategoriích cílového druhu, za použití doporučeného způsobu podání. Zvířata se pozorují a vyšetřují nejméně 14 dnů po posledním podání vakcíny na příznaky sytémových a místních reakcí. Zapisují se další objektivní kritéria, jako jsou rektální teploty (u savců) a výsledky dalších měření.

Rezidua. Normálně není nutné provádět studie reziduí. Avšak, pokud byla ve výrobě použita adjuvancia nebo konzervační přípravky nebo obojí, měla by se zvážit možnost přetrvávání jejich reziduí v potravinách. Je-li třeba, vyšetří se účinek těchto reziduí. Mimo to, v případě živé vakcíny určené proti entzooticky se vyskytujícím zoonozám, se může požadovat určení reziduálního vakcinačního agens v místě podání spolu se studií rozsevu v organismu, která je popsána dále.

Nežádoucí účinky na imunologické funkce. Jestliže podání vakcíny může nepříznivě ovlivnit imunitní systém očkovaného zvířete nebo jeho potomstva, provedou se vhodné zkoušky imunologických funkcí.

Speciální požadavky na živé vakcíny. Živé vakcíny se podrobí následujícím laboratorním zkouškám.

a) Šíření vakcinačního kmene. Šíření vakcinačního kmene z očkovaného na neočkované cílové zvíře se zkouší za použití doporučeného způsobu podání, který nejpravděpodobněji způsobuje toto

šíření. Mimo to může být nutné vyšetřit bezpečnost šíření na necílové druhy, které mohou být vysoce citlivé na živý vakcinační kmen. Stanoví se možný pravděpodobný počet pasáží ze zvířete na zvíře za normálních podmínek a jejich pravděpodobné následky.

b) Rozsev ve vakcinovaném zvířeti. Výkaly, moč, mléko, vejce, orální, nazální a jiné sekrety se zkouší na přítomnost vakcinačního organismu. Mimo to se může vyžadovat studie rozsevu vakcinačního kmene v těle se zaměřením na predilekční místa pro pomnožování organismu. U živých vakcín jsou tyto zkoušky povinné z důvodů možnosti uplatnění zoonóz u potravinových zvířat.

c) Návrat nebo zvýšení virulence. Pro atenuované vakcíny se použije materiál z takové úrovně pasáže, která je pro cílový druh nejméně atenuovaná. Jedná se o materiál mezi matečným inokulem a konečným produktem. U ostatních živých vakcín se použije materiál z té pasáže, která má pravděpodobně největší virulenci pro cílový druh. Počáteční vakcinace se provede doporučeným způsobem, který nejpravděpodobněji vede k návratu virulence. Potom se provede nejméně pět dalších sériových pasáží na zvířatech cílového druhu. Kde je to technicky nemožné pro selhání organismu se vhodně pomnožovat, zkouška se opakuje a provede se největší počet pasáží, který je možný u cílového druhu. Je-li to nutné, může se mezi dvěma pasážemi *in vivo* provést jedna pasáž *in vitro*. Pasáž se provádí takovým způsobem, který nejpravděpodobněji povede k návratu virulence. Pro každou pasáž se použijí nejméně dvě plně vnímavá zvířata. Při každé pasáži se v použitém materiálu dokáže přítomnost živého vakcinačního organismu. Bezpečnost vysoce pasážovaného materiálu se porovná s nepasážovaným materiálem.

Pro určité viry se může v článku požadovat více pasáží na více zvířatech, pokud tato indikace odpovídá dostupným odborným údajům. Nejméně konečná pasáž se dělá na nejvhodnějších zvířatech, u nichž bylo určeno možné riziko.

d) Biologické vlastnosti vakcinačních kmenů. K co nejpřesnějšímu určení podstatných biologických vlastností vakcinačního kmene (např. neurotropismu) mohou být nutné další zkoušky. U vektorových vakcín se zkouší úroveň rizika změny tropismů nebo virulence kmene, a kde je třeba, provádějí se specifické zkoušky. Takové zkoušky se provádějí systematicky, jestliže je cizí gen inkorporován do kmene jako strukturální bílkovina.

e) Rekombinace nebo genomové sestavení kmene. Mělo by se uvažovat o pravděpodobnosti rekombinace nebo genomového sestavení s terénním nebo jiným kmenem.

B. Studie v terénu

Výsledky získané v laboratoři by se měly normálně doplnit o výsledky studií v terénu.

Pro savce produkující potraviny zahrnují tyto zkoušky měření rektální teploty u dostatečného počtu zvířat před a po očkování. Pro ostatní savce se takováto měření provádějí, pokud laboratorní studie ukazují, že zde může být problém. Velikost a přetrvávání místních reakcí, míry zvířat vykazujících lokální nebo systémové reakce se zaznamenávají. Kde je to vhodné, provádějí se měření.

C. Ekotoxicita

Provede se odhad možných nepříznivých vlivů vakcíny na prostředí a určí se nezbytná opatření na snížení tohoto rizika. Odhadne se pravděpodobný stupeň vystavení prostředí vlivu vakcíny vzhledem k cílovému druhu a způsobu podání vakcíny, vylučování přípravku a způsobu likvidace nepoužitých vakcín. Jestliže tyto faktory prokáží významný vliv vakcíny na prostředí, stanoví se její potenciální ekotoxicita vzhledem ke stanoveným vlastnostem vakcíny, např. pomocí zkoušek, které jsou popsány v této sekci.

5.2.7 Hodnocení účinnosti veterinárních vakcín

Při vývoji vakcín se provádějí zkoušky, jimiž se dokazuje účinnost vakcíny při jejím podání všemi doporučenými způsoby a metodami vakcinace na všech druzích a kategoriích zvířat, pro která je tato vakcína určena. Typy zkoušek účinnosti, jež se mají provést, se značně mění v závislosti na jednotlivém typu vakcíny.

Jako část zkoušek nebo k jejich doplnění se mohou provést při vývoji vakcíny k prokázání účinnosti zkoušky popsané ve specifických lékopisných článcích v odstavci Výroba. Je vhodné zvážit následující skutečnosti.

Podávaná dávka je množství přípravku doporučené k použití, obsahující nejnižší titr nebo účinnost očekávanou ještě na konci doby platnosti.

U živých vakcín se použije vakcína připravená z nejvíce atenuované pasáže, která je použita ve výrobě.

Zkouška účinnosti potvrdí všechny indikace. Např. požadavky na ochranu proti respirační chorobě se podpoří nejméně důkazem ochrany před klinickými příznaky respirační choroby. Kde je požadována ochrana před infekcí, dokáže se to užitím reizolačních technik. Má-li vakcína více indikací, její účinnost se prokáže pro každou z nich.

Vliv pasivně získaných a mateřských protilátek na účinnost vakcíny se prokáže přiměřeným způsobem. Uvedené nebo vyplývající údaje o začátku a trvání ochrany jsou podloženy údaji ze zkoušek.

Účinnost každé složky multivalentních a složených přípravků se prokazuje použitím složené vakcíny.

Je-li doporučeno současné podání, nebo tam, kde takovéto podání je součástí běžného vakcinačního schématu, provede se studie imunologické vzájemné snášenlivosti.

Všude, kde je přípravek doporučen jako součást vakcinačního schématu, se prokáže jeho plná účinnost při primovakcinaci nebo dodatkovém nebo přídatném očkování.

Laboratorní zkoušky

Zásadně se důkaz účinnosti provádí v plně kontrolovaných laboratorních podmínkách pomocí čelenže po podání vakcíny cílovému zvířeti v doporučených podmínkách použití. Čelenž se provádí kmenem odlišným od kmene, který byl použit při výrobě vakcíny. Podmínky, za kterých se provádí čelenž, se co nejvíce přizpůsobí přirozené infekci, např. způsobem podání a dávkou čelenžních organismů. Pokud je to možné, určí se imunitní mechanismus (imunita zprostředkovaná buňkami, humorální, lokální, celková, třídy imunoglobulinů), který se vytvoří po podání vakcíny cílovému zvířeti.

Zkoušky v terénu

Výsledky laboratorních zkoušek se obvykle doplní údaji získanými při zkouškách v terénu provedených na kontrolních neléčených zvířatech. Pokud laboratorní zkoušky nedovolují průkaz účinnosti, může se připustit, aby se provedl jen při zkouškách v terénu.

5.3 Statistické analýzy výsledků biologických zkoušek

1 Úvod
1.1 Obecný plán experimentu a přesnost
1.2 Výpočty

2 Náhodnost a nezávislost jednotlivých ošetření

3 Zkoušky závislé na kvantitativní odpovědi
3.1 Statistické modely
3.1.1 Test normality rozložení Shapiro-Wilk
3.2 Model rovnoběžnosti
3.2.1 Podmínky platnosti
3.2.2 Zkušební plány
3.2.2.1 Úplné znáhodnění
3.2.2.2 Náhodné bloky
3.2.2.3 Křížová zkouška
3.2.2.4 Latinské čtverce
3.2.3 Analýza rozptylu
3.2.4 Test validity
3.2.5 Odhad účinnosti a její meze spolehlivosti
3.2.6 Chybějící hodnoty
3.2.7 Částečně vyvážená zkouška
3.2.8 Příklady
3.2.8.1 Dvoudávková vícenásobná zkouška úplně znáhodněná
3.2.8.2 Třídávková metoda s náhodnými bloky bez opakování
3.2.8.3 Třídávková vícenásobná zkouška s latinskými čtverci bez opakování
3.3 Model poměru sklonů
3.3.1 Podmínky validity
3.3.2 Plán zkoušky
3.3.3 Analýza rozptylu
3.3.4 Test validity
3.3.5 Odhad účinnosti a její meze spolehlivosti
3.3.6 Chybějící hodnoty

4 Kvantální zkoušky
4.1 Úvod
4.2 Probitová metoda
4.3 Příklad

5 Kombinace výsledků zkoušky
5.1 Úvod
5.2 Vážený průměr účinností a jeho meze spolehlivosti založené na vnitřní variabilitě zkoušek
5.2.1 Homogenita odhadů účinnosti
5.3 Nevážený průměr účinností a jeho meze spolehlivosti založené na variabilitě mezi zkouškami
5.4 Příklad vážené průměrné účinnosti a jejich mezí spolehlivosti

6 Tabulky
6.1 Tabulka kritických hodnot t rozdělení (absolutní hodnoty)
6.2 Tabulka kritických hodnot χ^2-rozdělení

7 Slovník symbolů a popis vývojových diagramů
7.1 Slovník symbolů
7.2 Popis symbolů použitých ve vývojových diagramech

1 Úvod

Účelem tohoto textu je pomoci analytikům při plánování a analýze biologických zkoušek předepsaných lékopisem.

Metody popsané v této příloze nejsou závazné pro analýzu výsledků biologických zkoušek obsažených v závazné části lékopisu.

Mohou se použít i jiné pokusné plány a metody vyhodnocení, pokud nejsou méně spolehlivé než zde popsané metody.

1.1 Obecný plán experimentu a přesnost

Biologické metody jsou určeny pro zkoušení těch látek a přípravků, jejichž účinnost se nedá spolehlivě zjistit chemickými nebo fyzikálními metodami. Všude, kde je to možné, se ve zkouškách užívá princip porovnání se standardním přípravkem. Určuje se množství zkoušeného přípravku, které vyvolá stejný biologický efekt jako dané množství, jednotka standardního přípravku. Pro tyto metody biologických zkoušek je nezbytné, aby test standardního a testovaného přípravku byl proveden ve stejném čase a za podmínek, které jsou pro oba přípravky stejné nebo maximálně podobné.

Každý odhad účinnosti určený biologickou zkouškou má náhodnou chybu tkvící v biologické variabilitě odpovědí. Tato chyba by se měla, je-li to možné, stanovit z výsledků zkoušky vždy při užití oficiální metody. Metody plánování zkoušek a výpočet jejich chyb je popsán dále. Vždy před zavedením statistické metody je nutné pomocí předběžného testu stanovit dostatečný rozsah zkoušky (tj. dostatečné množství vzorků). Dále by měly být průběžně otestovány i další parametry (normalita, homogenita rozptylů).

Směrodatná odchylka (s) se může použít k stanovení mezí spolehlivosti[1)] neznámé účinnosti v závislosti na plánu experimentu a rozsahu vzorku. Pro biologické zkoušky se běžně používají 95% meze spolehlivosti. K výpočtu těchto mezí se používají statistické metody, které zajišťují s 95% pravděpodobností, že tyto meze obsahují skutečnou hodnotu účinnosti.

Samotné odhady přesnosti jsou zatíženy nezanedbatelnou chybou, jestliže nejsou založeny na velmi velkém počtu pozorování. Výpočty účinnosti mohou vést k chybným závěrům, pokud se při stanovení jejich mezí spolehlivosti nebere na tuto skutečnost ohled. Meze spolehlivosti pro účinnost poskytují míru přesnosti, s níž byla zkouška provedena. Určují, zda přesnost vyhovuje lékopisu v závislosti na požadavcích předepsaných pro tento přípravek.

Výraz "směrodatná odchylka" přesně znamená "standardní chyba průměru". Výrazy "průměr" a "směrodatná odchylka" jsou zde použity tak, jak jsou definovány v běžných biometrických učebnicích.

Výrazy "udaná účinnost" nebo "deklarovaná účinnost", "předpokládaná účinnost", "relativní účinnost" a "odhadnutá účinnost" jsou použity v tomto smyslu:

- "udaná účinnost" nebo "deklarovaná účinnost" označují u předepsaného přípravku nominální hodnotu určenou ze znalosti účinnosti materiálu, u hromadně vyrobeného materiálu z účinnosti odhadnuté výrobcem;

---

1) V článcích Evropského lékopisu se užívá termínu "fiducial limits", obvykleji "confidence limits" (konfindenční meze). Konfidenční meze se nesmí zaměňovat s tolerančními mezemi, které určují interval, v němž se s 95% pravděpodobností očekává dané procento (např. 90%) odhadů účinnosti v budoucích zkouškách.

- "předpokládaná účinnost" zkoušeného přípravku je východiskem ke stanovení jeho dávek odpovídající ekvipotentní dávce standardního přípravku ve srovnávací zkoušce;
- "relativní účinnost" neznámého přípravku je podíl stejně účinných dávek standardního a testovaného přípravku;
- "odhadovaná účinnost" je účinnost vypočítaná z výsledků zkoušky.

V kapitole *7.1* (Slovník symbolů) je seznam symbolů použitých v této příloze. Tam, kde jsou v textu použity symboly, které nejsou popsány v této kapitole nebo jsou použity v jiném smyslu, je to uvedeno v dané části textu.

1.2 Výpočty

Rozvoj elektronických kalkulaček a počítačů zbavil biometra obtíží se zdlouhavými výpočty spojenými s hodnocením výsledků biologických zkoušek. Protože požadavky klasických statistických metod díky rozvoji výpočetní techniky nevyžadují téměř žádný čas a práci, mizí potřeba jejich náhrady rychlými přibližnými metodami.

Pomoc elektroniky při výpočtech je různá, od kapesních kalkulaček se čtyřmi aritmetickými operacemi až po rozsáhlé sálové počítače. Je zřejmé, že žádný popis analýzy biologických zkoušek nemůže odpovídat všem druhům této techniky.

Ačkoliv každá kalkulačka poskytuje určité služby, vyhodnocení biologických zkoušek usnadní zejména následující funkce:
- alespoň šest pamětí, které umožní manipulaci s n dvojicemi proměnných x a y, tj. umožní uložení n, Σx, Σx^2, Σy, Σy^2, Σxy;
- klávesy $\ln x$, e^x, $\sqrt{x}$ a π;
- alespoň třicet programovacích kroků.

Při psaní vzorců v následujících paragrafech předpokládáme, že kalkulačka tyto požadavky splňuje. Nevýhodou použití kalkulaček je ztráta možnosti provádět i kontrolu. To může být napraveno třemi způsoby kontroly:
- kontrolou přesnosti kalkulačky. Pro kontrolu přesnosti kalkulaček a počítačů byly vytvořeny datové soubory[2]. Skupina sedmi takových testů je v tabulce 1.2-I;
- kontrolou výpočetního algoritmu pomocí dat, u kterých je znám správný výsledek;
- provedením celého výpočtu zkoušky druhou osobou.

Pro vyhledávání zdrojů chyb je velmi užitečný tisk a zobrazení vstupních dat, mezivýsledků a grafické zobrazení biologické odpovědi jako funkce dávky.

Některé kalkulačky obsahují rezidentní program, který mimo jiné umožňuje i výpočet směrodatné odchylky. Experimentátor by měl pomocí tabulky 1.2-I zkontrolovat, zda se tak získá druhá odmocnina populačního rozptylu (součet čtverců dělený počtem pozorování) nebo druhá odmocnina výběrového rozptylu [součet čtverců odchylek dělený (počtem pozorování - 1)].

[2] Greenfield and Siday: The Statistician, 29, 1980, 33-35.

Tab. 1.2-I Data pro kontrolu přesnosti kalkulátoru

Data					Průměr	Výběrový rozptyl	Výběrová směrodatná odchylka
8	9	10	11	12	10	2,50	1,581 138 = s
0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,0	$2{,}50 \cdot 10^{-2}$	$s \cdot 10^{-1}$
0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,10	$2{,}50 \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-2}$
0,008	0,009	0,010	0,011	0,012	0,010	$2{,}50 \cdot 10^{-6}$	$s \cdot 10^{-3}$
78	79	80	81	82	80	2,50	s
708	709	710	711	712	710	2,50	s
7008	7009	7010	7011	7012	7010	2,50	s

Každý výpočet rozptylu odpovědí y ve výběru o rozsahu n je součet n čtverců odchylek všech odpovědí od výběrového průměru $\bar{y}$.

$$s_y^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1} \tag{1.2-1}$$

Tento součet čtverců se dá počítat alespoň dvěma způsoby:

1. nejprve se vypočte průměr $\bar{y}$; pak odchylky každé odpovědi y od $\bar{y}$, ty se umocní a čtverce sečtou. Tato metoda je méně citlivá na chybu vzniklou zaokrouhlováním, ale je početně náročnější. Při použití počítače se musí uložit do paměti všechny hodnoty y;
2. přepsáním vzorce do tvaru:

$$\sum (y - \bar{y})^2 = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \,. \tag{1.2-2}$$

Před zavedením elektronických kalkulaček s větší pamětí se tento vzorec používal často, neboť umožnil provést výpočet na jednoduché stolní kalkulačce nebo užití tabulek čtverců. Pokud počet platných číslic Σy^2 překročí kapacitu kalkulaček, může tato metoda poskytovat méně přesné výsledky.

Tato nepříjemnost se dá potlačit odečtením první zjištěné hodnoty y od dalších hodnot y. Tato změna neovlivní hodnotu směrodatné odchylky, ale získaný průměr se musí nakonec zvětšit právě o tuto první zjištěnou hodnotu veličiny y.

2 Náhodnost a nezávislost jednotlivých ošetření

Výběr pokusných jednotek (zvířat, zkumavek atd.) pro jednotlivá ošetření by se měl provést čistě náhodně. Náhodně by se měl provést i každý jiný výběr pokusných podmínek, nebyl-li pokusným plánem úmyslně jinak stanoven. Příkladem je výběr polohy klecí v laboratoři a pořadí, u něhož se provede ošetření. Konkrétně: skupina zvířat, která obdrží stejnou dávku, by neměla být ošetřena společně (ve stejném čase a místě), pokud nemáme spolehlivý důkaz, že tyto zdroje nehomogenity (např. rozdíly v čase nebo místě) jsou zanedbatelné.

Náhodný výběr se dá provést pomocí standardních tabulek náhodných čísel. U těchto tabulek obvykle bývá i návod k jejich použití (viz např. Fisher R.A. a Yates F. [3]). Náhodná čísla se dají získat i pomocí kalkulaček nebo počítačů, které využívají zabudovaných generátorů náhodných čísel, nebo výpočtem, například pomocí vzorce:

$$x_{i+l} = (ax_i + l) \bmod z \,, \qquad (2\text{-}1)$$

kde a, l a z jsou konstanty. Vhodné hodnoty a, l a z pro tento vzorec uvádějí například Hull a Dobell[4]. Možnost testovat, zda generovaná čísla jsou skutečně náhodná, popsali např. McLaren a Marsaglia[5]. Pokud používáme generátor náhodných čísel, není provádění testu náhodnosti nadbytečné. Navíc musíme ještě zkontrolovat, zda generátor při opakovaném použití tvoří různé posloupnosti náhodných čísel.

Pro naše účely jsou vhodnější tabulky náhodných permutací. Pokud nemáme tyto tabulky k dispozici, dají se náhodné permutace čísel 1 až N vytvořit za pomoci náhodných čísel a jednoduchého algoritmu, který popsal Coan[6], viz tabulka 2-I.

Je nutno dbát na to, aby pokaždé byla použita jiná posloupnost náhodných čísel, případně jiná náhodná permutace.

Tab. 2-I Algoritmus generování náhodných permutací čísel 1 až N

1. Napište čísla od 1 do N do řádku A a pod každé napište jeho pořadové číslo (1 až N).
2. Řádek B vyhraďte pro náhodnou permutaci těchto čísel.
3. Vygenerujte náhodné číslo r tak, aby $0 < r \leq 1$.
4. Vypočtěte x = celá část z ($rN + 1$), je tedy $1 \leq x \leq N$.
5. x-té číslo ze sloupce A napište na první volnou pozici ve sloupci B.
6. Vezměte N-té číslo sloupce A a napište je na x-tou pozici sloupce A.
7. Položte $N = N - 1$ a opakujte kroky 3 až 7, pokud jsou ve sloupci B prázdná místa.

Přidělení přípravku k experimentálním jednotkám musí být pokud možno náhodné. Různé dávky přípravku pro jednotlivá ošetření by se neměly získávat jednoduše ředěním základní dávky, ale měly by se připravovat jednotlivě. Bez těchto nutných předběžných opatření nebude v experimentální chybě obsažena variabilita přípravy vzorků. Výsledek bude podhodnocovat reziduální chybu, což povede:

1. k neopodstatněnému zpřísnění testů v analýze rozptylu (viz kapitola 3.2.3 a 3.2.4);
2. k zúžení skutečných mezí spolehlivosti testu, který (viz kapitolu 3.2.5) se počítá z odhadu s^2, reziduální chyby průměru.

---

[3] Fisher, R. A., Yates, F.: Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. 6th Ed. Edinburgh, Oliver and Boyd 1993.

[4] Hull, Dobell: Soc. Ind. App. Math., 4, 1962, 230-254.

[5] McLaren and Marsaglia: J. Assoc. Com. Mach., 12, 1965, 83-89.

[6] Coan: Advanced Basic. New Jersey, Hayden Book Company Inc. 1977.

3 Zkoušky závislé na kvantitativní odpovědi

3.1 Statistické modely

Biologické zkoušky obsažené v lékopise jsou založeny na principu "ředění". O neznámém testovaném přípravku se předpokládá, že obsahuje stejnou aktivní složku jako standardní přípravek, ale s jiným poměrem aktivní a neúčinné složky. Teoreticky je v tomto případě neznámý přípravek pouze ředěním standardního přípravku pomocí nějaké neúčinné látky. Má-li se ověřit, zda se konkrétní právě prováděná zkouška řídí tímto modelem, je nutné vyzkoušet závislost odpovědi na ředění standardu. Pokud se v prováděné zkoušce výrazně liší průběh závislosti na dávce standardního a neznámého přípravku, není model pro tuto konkrétní zkoušku použitelný.

Aby bylo možno lépe analyzovat vliv ředění na biologickou odpověď, je vhodné transformovat tuto závislost na lineární. Pro statistickou analýzu biologických zkoušek jsou určeny dva modely: model rovnoběžnosti a model poměru sklonů.

Jejich použití je závislé na následujících podmínkách:

1. pokusným jednotkám jsou náhodně přidělena jednotlivá ošetření,
2. odpověď každého ošetření má normální rozdělení,
3. směrodatná odchylka odpovědi uvnitř každé skupiny stejně ošetřené není závislá na střední hodnotě odpovědi v této skupině.

Podmínku 1 lze splnit správným použitím návodu z kapitoly 2. Pokud je podezření na odchylku od normality, může se použít Shapiro-Wilk test. Tento test je krátce popsán v kapitole 3.1.1. Pokud je podezření na porušení podmínek 2 a/nebo 3, může pomoci ke splnění těchto podmínek některá z transformací odpovědi y: ln (y), $\sqrt{y}$ nebo $1/y$. V učebnicích statistiky se najdou ještě další transformace.

Experimentátor by se měl při zavedení metody v laboratoři rozhodnout pro typ transformace přiměřený biologické zkoušce. Pokud nejsou později při rutinním provádění biologické zkoušky splněny podmínky 2 a/nebo 3, neměla by být použita jiná transformace. Ke změně transformace může experimentátor přistoupit až po ověření, že nesplnění požadavků není náhodné, ale je způsobeno systematickou změnou experimentálních podmínek. V tomto případě by se měl znovu provést předběžný test transformace, která se bude dále pro tuto biologickou zkoušku rutinně používat.

Zvláštní kategorii tvoří zkoušky, v nichž odpověď nelze měřit na jednotlivých experimentálních jednotkách, ale ve kterých se zjišťuje pouze podíl jednotek reagujících na ošetření. Tyto zkoušky se nazývají kvantální a metodě jejich hodnocení je věnována kapitola 4. Při použití této metody se předpokládá splnění podmínek 2 a 3.

Dvě další podmínky závisí na zvoleném statistickém modelu:

A. Model rovnoběžnosti (viz obr. 3.2.5-I) předpokládá lineární vztah mezi odpovědí Y a logaritmem X dávky D:

$$Y = a + bX\,, \tag{3.1-1}$$

kde: Y je očekávaná odpověď,
X = ln dávky = ln D,
a a b jsou dvě konstanty.

Zředí-li se přípravek faktorem 2, zmenší se hodnota X v uvedeném vztahu o hodnotu ln 2 a vztah nabude tvaru:

$$Y = a + b(X - \ln 2) = a - b \ln 2 + bX = a' + bX\,.$$

Všechny odpovědi se zmenší o hodnotu b ln 2, tj. přímka závislosti odpovědi na logaritmu dávky se posune rovnoběžně. Aby se tedy mohla zkouška analyzovat pomocí tohoto modelu, musí být splněny následující podmínky:

4A. Závislost odpovědi na logaritmu dávky musí být lineární v celém rozsahu použitých dávek.

5A. Pro zkoušený přípravek musí být přímka závislosti na logaritmu dávky rovnoběžná s přímkou závislosti standardu.

Podmínka 4A se dá ověřit pouze ve zkouškách, ve kterých jsou použita nejméně tři ředění přípravku. Zkoušky, které používají pouze dvě ředění, vycházejí z předpokladu, že předchozí studie splnění této podmínky prokázaly.

B. Model poměru sklonů (viz obr. 3.3.5-I) je založen na lineární závislosti odpovědi y na dávce D.

$$y = a + bD\,, \tag{3.1-2}$$

kde a a b jsou opět dvě neznámé konstanty. Ředění přípravku faktorem 2 zde vede ke vztahu:

$$y = a + b(0{,}5D) = a + 0{,}5bD = a + b'D\,.$$

V tomto případě se objeví jiná konstanta sklonu b' na rozdíl od modelu rovnoběžnosti, v němž se mění konstanta a (průsečík s osou y). Nezávisle na ředění se pro $D = 0$ vztah změní na:

$$Y = a\,. \tag{3.1-3}$$

Pro model sklonu je tedy nutno splnit kromě podmínek 1, 2 a 3 ještě tyto dvě podmínky:

4B. Závislost odpovědi na dávce musí být lineární v oboru dávek použitých ve zkoušce pro každý přípravek.

5B. Pro všechny zkoušené přípravky musí regresní přímky protínat osu y ve stejném bodě jako přímka standardního přípravku (tj. přímky odpovědí všech zkoušených přípravků i standardu se musí protínat ve stejném bodě).

Pokud některá z pěti podmínek (1 až 3 a buď 4A a 5A, nebo 4B a 5B) není splněna, nejsou zde popsané metody vhodné, a je nutno použít jiných speciálních technik.

Potvrdí-li se použitelnost některého z uvedených modelů, počítá se obvykle účinnost zkoušeného přípravku vzhledem k standardu jako podíl dávek se stejným účinkem nebo se vyjadřuje množstvím jednotek, například mezinárodních jednotek. Pro obojí lze též vypočítat meze spolehlivosti.

Použití jednoduchých, dále popsaných statistických postupů vyžaduje při plánování zkoušek splnění následujících požadavků:

a) testované přípravky i standard se musí zkoušet se stejným počtem ředění. Obvykle se používají dvě nebo tři ředění;

b) v modelu rovnoběžnosti musí být poměr sousedních ředění stejný pro všechna ošetření. V modelu poměru sklonů musí být rozdíl sousedních dávek stejný pro všechna ošetření;

c) všechna ošetření se musí provést na stejném počtu pokusných jednotek.

Testy založené na modelu rovnoběžnosti jsou popsány v kapitole 3.2.6, 3.3.6 a na modelu poměru sklonů v kapitole 3.2.7.

3.1.1 Test normality rozložení Shapiro-Wilk

Test, který navrhli Shapiro a Wilk, se osvědčil jako velmi dobrý obecný test pro společné potvrzení normality odpovědí nebo chyby měření v několika nezávislých, malých vzorcích, vybraných náhodně z populací s přibližně stejným rozdělením, ale s různými průměry nebo směrodatnými od-

chylkami. Tento test je dále popsán pro skupiny o rozsahu 7 a více. Použití testu na menších skupinách je složitější[7)].

Testovací statistika pro k nezávislých skupin o rozsahu n, vybraných náhodně z k populací, je definována jako:

$$t = \frac{\sum H}{\sqrt{k}} \ . \qquad (3.1.1\text{-}1)$$

Má Studentovo t-rozdělení s ∞ stupni volnosti. Jeho kritické hodnoty jsou v tabulce 6.1. Veličina H se počítá pro každé ošetření zvlášť.

Nejprve se vypočte pro každou ošetřovanou skupinu:

$$v = \frac{\left(\sum a_i y_i\right)^2}{\sum (y - \bar{y})^2} \ , \qquad (3.1.1\text{-}2)$$

kde jmenovatel je stejný jako čitatel ve výrazu (1.2-1) a čitatel se získá pomocí tabulky 3.1.1-I. Před výpočtem součinu $a_i y_i$ je nutno seřadit hodnoty y_i od nejmenší k největší a pak vynásobit y_i postupně hodnotami a_i z tabulky ve stejném pořadí.

Mají-li dvě měření stejnou hodnotu, tj. $y_i = y_{i+1}$, vynásobí se obě průměrem odpovídajících koeficientů, tj.:

$$\frac{a_i + a_{i+1}}{2} \ .$$

Získaná hodnota v se použije k výpočtu:

$$V = \ln\left(\frac{v - a}{1 - v}\right) \ , \qquad (3.1.1\text{-}3)$$

kde a je koeficient z tabulky 3.1.1-II pro rozsah n příslušné skupiny. Pro výpočet H se dále použijí koeficienty m a q z téže tabulky:

$$H = q + m\,V \ . \qquad (3.1.1\text{-}4)$$

Použití tohoto testu je popsáno v příkladu 3.2.8.1 (dvoudávková úplně znáhodněná mnohonásobná zkouška o rozsahu $k = 6$ a $n = 10$).

---

7) Podrobnější popis In: Shapiro, S. S., Wilk, M. B.: An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika, 52, 1965, 591-611; nebo Wilk, M. B., Shapiro, S. S.: The joint assesment of normality of several independent samples. Technometrics, 10, 1968, 825-839.

Tab. 3.1.1-I Koeficienty a_i pro test normality Shapiro-Wilk

i/n	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	-0,623	-0,605	-0,589	-0,574	-0,560	-0,548	-0,536	-0,525	-0,515	-0,506	-0,497	-0,489	-0,481	-0,473
2	-0,303	-0,316	-0,324	-0,329	-0,332	-0,332	-0,332	-0,332	-0,331	-0,329	-0,327	-0,325	-0,323	-0,321
3	-0,140	-0,174	-0,198	-0,214	-0,226	-0,235	-0,241	-0,246	-0,250	-0,252	-0,254	-0,255	-0,256	-0,256
4	0,000	-0,056	-0,095	-0,122	-0,143	-0,159	-0,171	-0,180	-0,188	-0,194	-0,199	-0,203	-0,206	-0,208
5	0,140	0,056	0,000	-0,040	-0,070	-0,092	-0,110	-0,124	-0,135	-0,145	-0,152	-0,159	-0,164	-0,169
6	0,303	0,174	0,095	0,040	0,000	-0,030	-0,054	-0,073	-0,088	-0,100	-0,111	-0,120	-0,127	-0,133
7	0,623	0,316	0,198	0,122	0,070	0,030	0,000	-0,024	-0,043	-0,059	-0,072	-0,084	-0,093	-0,101
8		0,605	0,324	0,214	0,143	0,092	0,054	0,024	0,000	-0,020	-0,036	-0,050	-0,061	-0,071
9			0,589	0,329	0,226	0,159	0,110	0,073	0,043	0,020	0,000	-0,016	-0,030	-0,042
10				0,574	0,332	0,235	0,171	0,124	0,088	0,059	0,036	0,016	0,000	-0,014
11					0,560	0,332	0,241	0,180	0,135	0,100	0,072	0,050	0,030	0,014
12						0,548	0,332	0,246	0,188	0,145	0,111	0,084	0,061	0,043
13							0,536	0,332	0,250	0,194	0,152	0,120	0,093	0,071
14								0,525	0,331	0,252	0,199	0,159	0,127	0,101
15									0,515	0,329	0,254	0,203	0,164	0,133
16										0,506	0,327	0,255	0,206	0,169
17											0,497	0,325	0,256	0,208
18												0,489	0,323	0,256
19													0,481	0,321
20														0,473

Tab. 3.1.1-II Koeficienty *a*, *q* a *m* pro test normality Shapiro-Wilk

n	*a*	*q*	*m*
7	0,453	-2,36	1,24
8	0,419	-2,70	1,33
9	0,390	-2,97	1,40
10	0,366	-3,26	1,47
11	0,345	-3,48	1,52
12	0,327	-3,73	1,57
13	0,311	-3,94	1,61
14	0,297	-4,16	1,66
15	0,284	-4,37	1,70
16	0,273	-4,57	1,72
17	0,262	-4,71	1,74
18	0,253	-4,88	1,77
19	0,244	-5,02	1,79
20	0,236	-5,15	1,80

3.2 Model rovnoběžnosti

3.2.1 Podmínky platnosti

Jak již bylo řečeno, musí se před vypočtením účinnosti ověřit použitelnost modelu (viz kapitola 3.1 - požadavek splnění tří podmínek). I když dodržení požadavku náhodnosti výběru v jedné zkoušce nezpůsobuje velké problémy, při provádění většího počtu paralelních zkoušek najednou je nutné zajistit, aby se série náhodných čísel nebo permutace neopakovaly.

Po získání všech odpovědí je nutno provést jejich kontrolu. Musí se zkontrolovat normalita jejich rozložení a v případě pochyb testem Shapiro-Wilk. Dále by se měla ověřit shoda variability v jednotlivých ošetřených skupinách. K tomu slouží testy, které navrhli například Bartlett[8)] nebo Hartley[9)]. Kritické hodnoty pro použití Hartleyova testu pro podíl největšího a nejmenšího rozptylu ve skupinách jsou v tabulce 3.2.1-I.

Již v kapitole 3.1 bylo zmíněno, že použitá transformace odpovědí se nemůže měnit bez dostatečného odůvodnění toho, že porušení podmínek 2 a/nebo 3 je podstatné, a nikoliv nahodilé.

Pokud je dostatečně zajištěno splnění podmínek 1, 2 a 3 kapitoly 3.1, může se přistoupit k provedení analýzy rozptylu a k ověření předpokladů 4A a 5A, (viz kapitola 3.2.4). Účinnost testovaného přípravku pak může být vypočtena pouze za předpokladu, že výsledky analýzy rozptylu jsou uspokojivé.

Tab. 3.2.1-I Kritické hodnoty podílu maximálního a minimálního rozptylu pro test homogenity rozptylů v *k* skupinách stejného rozsahu, každá s *f* stupni volnosti pro $P = 0{,}95$ (v závorkách pro $P = 0{,}99$) - Hartleyův test

f/k	4	6	8	9	10	12
4	20,6 49	29,5 69	37,5 89	41,1 97	44,6 106	51,4 120
5	13,7 28	18,7 38	22,9 46	24,7 50	26,5 54	29,9 60
6	10,4 19,1	13,7 25	16,3 30	17,5 32	18,6 34	20,7 37
7	8,44 14,5	10,8 18,4	12,7 22	13,5 23	14,3 24	15,8 27
8	7,18 11,7	9,03 14,5	10,5 16,9	11,1 17,9	11,7 18,9	12,7 21
9	6,31 9,9	7,80 12,1	8,95 13,9	9,45 14,7	9,91 15,3	10,7 16,6
10	5,67 8,6	6,92 10,4	7,87 11,8	8,28 12,4	8,66 12,9	9,34 13,9

8) Bartlett, M. S.: Properties of sufficienty and statistical tests. Proc. Roy. Soc. London, Series A, 160, 1937, 280-282.
9) Hartley, H. O.: The maximum *F*-ratio as a short-cut test for heterogeneity of variance. Biometrika, 37, 1950, 308-312.

Podmínka 2 (normalita) je velmi důležitá, obzvláště při nízkém počtu pokusných jednotek na dávku. V některých výjimečných případech obzvlášť přesných zkoušek je možné tolerovat malou odchylku od podmínky 4A (nelinearitu). Odchylka může být způsobena:
- výjimečnými okolnostmi;
- malou variabilitou odpovědí na jednotlivé dávky.

Na druhé straně podmínka 5A (rovnoběžnost) a opačné zakřivení u standardu a testovaného přípravku musí být striktně kontrolovány. Nedodržení některé z těchto podmínek ve zkoušce znamená, že srovnávané přípravky není možno považovat za různá ředění aktivní složky v neaktivním rozpouštědle, takže relativní účinnost nelze stanovit.

Jsou-li rozdíly mezi výběrovými rozptyly ve skupinách náhodné, překročí vypočtená hodnota F kritickou hodnotu s pravděpodobností $P = 0{,}05$, s pravděpodobností $P = 0{,}95$ ji nepřekročí [10]. Kritické hodnoty v závorkách mají tentýž význam pro $P = 0{,}01$.

3.2.2 Zkušební plány

Přiřazení pokusných jednotek jednotlivým ošetřením může být provedeno různým způsobem.

3.2.2.1 Úplné znáhodnění

Pokud je soubor pokusných jednotek (zvířat, zkumavek apod.) dostatečně homogenní a pokud nelze předem nalézt části souboru s menší variabilitou odpovědí, může být ošetření jednotlivým pokusným jednotkám přiřazeno náhodně, například pomocí tabulky náhodných permutací.

Když jsou podskupiny jednotek homogennější než celek, například vlivem tělesného stavu nebo pokusného dne, může být přesnost zkoušky zvýšena zavedením dalších omezení v pokusném plánu. Pečlivé vyvážení plánu s ohledem na tyto okolnosti zajistí eliminaci vedlejších zdrojů variability.

3.2.2.2 Náhodné bloky

Pomocí tohoto plánu se mohou vyloučit známé zdroje variability, jako například rozdíl mezi jednotlivými vrhy pokusných zvířat nebo rozdíl mezi jednotlivými Petriho miskami v složitých mikrobiologických zkouškách. Tento plán vyžaduje, aby počty všech ošetření v jednotlivých blocích (vrzích, Petriho miskách) byly stejné a tak velké, aby jednotlivé bloky mohly zahrnout všechna ošetření.

V tabulce 3.2.3-IV jsou vzorce pro plán náhodných bloků, v nichž se každé ošetření aplikuje jednou v každém bloku (plán náhodných bloků bez opakování). Použití je předvedeno v příkladu 3.2.8.2. Může se použít také plán úplných bloků s opakováním. Vzorce a příklady náhodných bloků s opakováním stejného ošetření v každém bloku se najdou v publikacích o biologických zkouškách. Takovýto plán pokusu je užitečný k určení reziduálního rozptylu s vyloučením vlivu interakce mezi různými faktory a k prokázání případné existence těchto interakcí. Pokud jsou významné rozdíly mezi replikacemi úplné skupiny ošetření uvnitř stejného bloku, je nutné použít jiný plán, v němž se jako samostatné berou bloky obsahující každé ošetření pouze jednou.

3.2.2.3 Křížová zkouška

Tento plán je užitečný, je-li možné pokus rozdělit do bloků, z nichž každý obsahuje pouze dvě ošetření, například blok tvoří jedna pokusná jednotka ošetřená dvakrát při různých podnětech. Tento

---

[10] Pearson, E. S., Hartley, H. O.: Tables for Statisticians. Biometrika, Vol. I. Cambridge University Press, 1954.

plán pokusu sleduje zvýšení přesnosti omezením vlivu rozdílu mezi pokusnými jednotkami tím, že vyvažuje efekt rozdílu odpovědí na oba podněty.

Pokus, v kterém se testují dvě dávky standardu proti dvěma dávkám přípravku, se nazývá dvoudávkový křížový pokus a podobně pro test se třemi dávkami obou podnětů se používá název třídávkový křížový pokus.

Pokus je rozdělen do dvou vhodných časových intervalů. Pokusné jednotky jsou rozděleny do čtyř (případně šesti) skupin a ošetřeny nejprve jednou ze čtyř (šesti) dávek a později jsou tytéž jednotky ošetřeny tak, že ty jednotky, které byly ošetřeny menší dávkou, budou ošetřeny dávkou větší a naopak. U jednotlivých pokusných jednotek se též zamění aplikace standardu za přípravek a naopak. Rozložení dávek je zobrazeno v tabulce 3.2.2-I.

Tab. 3.2.2-I Rozdělení jednotlivých dávek v křížovém pokusu

	Dvoudávkový křížový pokus		Třídávkový křížový pokus	
Skupina jednotek	Čas I	Čas II	Čas I	Čas II
1	*s*1	*u*2	*s*1	*u*3
2	*s*2	*u*1	*s*2	*u*2
3	*u*1	*s*2	*s*3	*u*1
4	*u*2	*s*1	*u*1	*s*3
5	-	-	*u*2	*s*2
6	-	-	*u*3	*s*1

3.2.2.4 Latinské čtverce

Tento plán experimentu je vhodný, ovlivňují-li odpověď dva různé rušivé vlivy nabývající *k* různých úrovní. Například zkouška antibiotik se provádí na destičce rozdělené do *k* x *k* polí tak, že každé z *k* ošetření je právě jednou v každém sloupci a v každém řádku destičky. Tento plán pokusu je použitelný při stejném počtu sloupců, řádků i ošetření.

Výsledky jsou zaznamenávány do tabulky *k* x *k*, nazývané latinský čtverec. Variabilita odpovědi způsobená rozdíly v poloze ošetření na destičce (mezi *k* sloupci a *k* řádky) je rovnoměrně rozdělena a tím je tedy snížena chyba.

V tabulce 3.2.3-V jsou uvedena schémata latinských čtverců, ve kterých se každé ošetření objevuje v každém řádku a každém sloupci právě jednou. Použití je popsáno v příkladu 3.2.8.3. Vzorce a příklady pro opakované latinské čtverce jsou popsány v publikacích textu o biologických zkouškách.

Instrukce pro náhodný výběr latinského čtverce se najde v tabulkách (viz Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research, R. A. Fisher and F. Yates, Oliver and Boyd). Při každém použití tohoto plánu by měl být výběr pokusných jednotek do bloků proveden náhodně a pokusné jednotky by měly být vystaveny stejným podmínkám před i během pokusu.

3.2.3 Analýza rozptylu

Bez ohledu na některé úpravy chybového členu je základ analýzy výsledků zkoušek stejný pro všechny výše zmíněné plány experimentu. Tato kapitola obsahuje vzorce pro provedení analýzy a v příkladech kapitoly 3.2.8 je podrobněji objasněna interpretace výsledků analýzy. Vzorce jsou přizpůsobeny provádění jednoduchých zkoušek porovnávajících jeden přípravek ($\underline{U}$) se standardem

($\underline{S}$) a vícenásobných zkoušek s několika testovanými přípravky ($\underline{U}$... $\underline{Z}$). Vzorce pro vyhodnocení křížových pokusů nelze plně schematizovat, analýza jednoho takovéhoto pokusu je obsažena v příkladě 3.2.8.4.

Vezmou-li se v úvahu body diskutované v kapitole 3.1 a v případě potřeby se transformují odpovědi, mohou se hodnoty y sečíst pro každé ošetření a každý přípravek, jak je to patrné v tabulkách 3.2.3-I, 3.2.3-II a 3.2.3-III. Dále se může stanovit lineární kontrast, který odpovídá sklonu přímky vyjadřující závislost odpovědi na logaritmu dávky. V modelu se třemi dávkami se dá testovat nelinearita tohoto vztahu pomocí kvadratického kontrastu.

Celková variabilita odpovědí, kterou způsobují různá ošetření, se rozkládá na složky uvedené v tabulce 3.2.3-IV. Součty čtverců se vypočtou z hodnot v tabulkách 3.2.3-I, 3.2.3-II nebo 3.2.3-III.

Reziduální chyba zkoušky se získá odečtením složek variability tvořených modelem od celkové variability odpovědi (tabulka 3.2.3-V). V této tabulce Σy^2 představuje součet čtverců všech odpovědí ve zkoušce. Součet čtverců pro ošetření je roven součtu čtverců v tabulce 3.2.3-IV přes všechny zdroje variability. Pro latinské čtverce je počet opakovaných odpovědí (n) stejný jako počet řádků, sloupců a ošetření (k).

Tab. 3.2.3-I Vzorce pro zkoušky s dvěma dávkami přípravků

	Standard *($\underline{S}$)*	1. testovaný přípravek *($\underline{U}$)*	(h - 1) testovaný přípravek *($\underline{Z}$)*
celková odpověď - nízká dávka	S_1	U_2	Z_1
celková odpověď - vysoká dávka	S_2	U_2	Z_2
celková odpověď pro přípravek	$S_1 + S_2 = S$	$U_1 + U_2 = U$	$Z_1 + Z_2 = Z$
lineární kontrast	$S_2 - S_1 = L_S$	$U_2 - U_1 = L_U$	$Z_2 - Z_1 = L_Z$

Tab. 3.2.3-II Vzorce pro zkoušky s třemi dávkami přípravků

	Standard *($\underline{S}$)*	1. testovaný přípravek *($\underline{U}$)*	(h - 1) testovaný přípravek *($\underline{Z}$)*
celková odpověď - nízká dávka	S_1	U_2	Z_1
celková odpověď - střední dávka	S_2	U_2	Z_2
celková odpověď - vysoká dávka	S_3	U_3	Z_3
celková odpověď pro přípravek	$S_1 + S_2 + S_3 = S$	$U_1 + U_2 + U_3 = U$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 = Z$
lineární kontrast	$S_3 - S_1 = L_S$	$U_3 - U_1 = L_U$	$Z_3 - Z_1 = L_Z$
kvadratický kontrast	$S_1 - 2S_2 + S_3 = Q_S$	$U_1 - 2U_2 + U_3 = Q_U$	$Z_1 - 2Z_2 + Z_3 = Q_Z$

Tab. 3.2.3-III Vzorce pro zkoušky se čtyřmi dávkami přípravků

	Standard *(S)*	1. testovaný přípravek *(U)*	(h - 1) testovaný přípravek *(Z)*
celková odpověď - nízká dávka	S_1	U_1	Z_1
celková odpověď - 2. dávka	S_2	U_2	Z_2
celková odpověď - 3. dávka	S_3	U_3	Z_3
celková odpověď - 4. dávka	S_4	U_4	Z_4
celková odpověď pro přípravek	$S_1 + S_2 + S_3 + S_4 = S$	$U_1 + U_2 + U_3 + U_4 = U$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 = Z$
lineární kontrast	$3S_4 + S_3 - S_2 - 3S_1 = L_S$	$3U_4 + U_3 - U_2 - 3U_1 = L_U$	$3Z_4 + Z_3 - Z_2 - 3Z_1 = L_Z$
kvadratický kontrast	$S_1 - S_2 - S_3 + S_4 = Q_S$	$U_1 - U_2 - U_3 + U_4 = Q_U$	$Z_1 - Z_2 - Z_3 + Z_4 = Q_Z$
kubický kontrast	$3S_2 - S_1 + S_4 - 3S_3 = J_S$	$3U_2 - U_1 + U_4 - 3U_3 = J_U$	$3Z_2 - Z_1 + Z_4 - 3Z_3 = J_Z$

Tab. 3.2.3-IV Testy validity

Zdroj variability	Stupně volnosti (f)	Součet čtverců u zkoušky		
		2dávkové	3dávkové	4dávkové
přípravky	h - 1	$\frac{S^2+U^2+...+Z^2}{2n}-K$	$\frac{S^2+U^2+...+Z^2}{3n}-K$	$\frac{S^2+U^2+...+Z^2}{4n}-K$
lineární regrese	1	$\frac{(L_S+L_U+...+L_Z)^2}{2nh}=E$	$\frac{(L_S+L_U+...+L_Z)^2}{2nh}=E$	$\frac{(L_S+L_U+...+L_Z)^2}{20nh}=E$
nerovnoběžnost	h - 1	$\frac{L_S^2+L_U^2+...+L_Z^2}{2n}-E$	$\frac{L_S^2+L_U^2+...+L_Z^2}{2n}-E$	$\frac{L_S^2+L_U^2+...+L_Z^2}{20n}-E$
kvadratická regrese	1	nelze	$\frac{(Q_S+Q_U+...+Q_Z)^2}{6nh}=Q$	$\frac{(Q_S+Q_U+...+Q_Z)^2}{4nh}=Q$
diference kvadratických členů	h - 1	nelze	$\frac{Q_S^2+Q_U^2+...+Q_Z^2}{6n}-Q$	$\frac{Q_S^2+Q_U^2+...+Q_Z^2}{4n}-Q$
nelinearita	h (3 dávky) $2h$ (4 dávky) $h = K$	nelze	$\frac{Q_S^2+Q_U^2+...+Q_Z^2}{6n}$	$\frac{Q_S^2+Q_U^2+...+Q_Z^2}{4n}+\frac{J_S^2+J_U^2+...+J_Z^2}{20n}$

Tab. 3.2.3-V Odhad reziduální chyby

Součet čtverců				
Zdroj variability	Stupně volnosti (f)	Úplně náhodný plán	Pokus v náhodných blocích bez opakování	Pokus v latinském čtverci
ošetření	k - 1	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \ldots Z_d^2}{n} - K$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \ldots Z_d^2}{n} - K$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \ldots Z_d^2}{n} - K$
bloky (řádky)	n - 1	nelze	$\frac{R_1^2 + R_2^2 + \ldots R_n^2}{k} - K$	$\frac{R_1^2 + R_2^2 + \ldots R_n^2}{k} - K$
bloky (sloupce)	n - 1	nelze	nelze	$\frac{C_1^2 + C_2^2 + \ldots C_n^2}{k} - K$
reziduální chyba	odečtením	*	*	*
celkem	N - 1	$\Sigma y^2 - K$	$\Sigma y^2 - K$	$\Sigma y^2 - K$

* Získá se odečtením všech ostatních součtů od součtu celkového.

3.2.4 Testy validity

K ověření významnosti zdrojů variability v tabulce 3.2.3-IV je nutné každý součet čtverců v tabulce dělit odpovídajícím počtem stupňů volnosti, čímž se získá průměrný čtverec.

Průměrný čtverec reziduální chyby (s^2) je stejný podíl odvozený z odpovídajícího řádku tabulky 3.2.3-V.

Průměrný čtverec pro každou testovanou veličinu se dělí s^2. Významnost takto získaných hodnot (nazývaných podíly F) se posoudí porovnáním s kritickými hodnotami F-rozdělení, které jsou uvedeny v tabulce 3.2.4-I. Kritické hodnoty F pro pravděpodobnost chyby 0,05 a 0,01 jsou ve sloupci, který odpovídá počtu stupňů volnosti testované veličiny (f_1), a řádku, který odpovídá počtu stupňů volnosti reziduálního rozptylu s^2 (f_2). Je-li vypočtená hodnota F větší než odpovídající tabelovaná hodnota, pokládá se testovaný zdroj variability za statisticky významný na hladině významnosti (0,05 nebo 0,01).

Pokud se nenajdou odpovídající počty stupňů volnosti f (f_1, f_2) v tabulce kritických hodnot, použije se největší uvedený počet stupňů volnosti menší než f. Pokud je vypočtená hodnota F větší než tato tabelovaná kritická hodnota, považuje se test poměru rozptylů za statisticky významný. Je-li vypočtená hodnota F menší než tabelovaná kritická hodnota, použije se kritická hodnota pro nejmenší uvedený počet stupňů volnosti větší než f. Je-li vypočtená hodnota testovací statistiky F menší, považuje se test podílu rozptylů za statisticky nevýznamný. Pokud však tento postup nevede k rozhodnutí, je nutno použít podrobnější tabulky.

Zkouška se pokládá za "statisticky validní" při těchto výsledcích testů:

1. Lineární složka variability je silně významná, tj. příslušná vypočtená hodnota F je větší než kritická hodnota pro $P = 0{,}01$. Tento test prokazuje, že sklon lineární závislosti odpovědí na logaritmu dávky je dostatečně různý od 0 (odpověď závisí na dávce podnětu).
2. Nelineární složky variability nejsou statisticky významné, tj. vypočtená hodnota F je menší než kritická hodnota pro $P = 0{,}05$. Tento test kontroluje splnění podmínky 4A z kap. 3.1.
3. Nerovnoběžnost není statisticky významná (viz podmínka 5A kapitoly 3.1).

Významnost odchylky od rovnoběžnosti ve vícenásobných zkouškách může být způsobena zahrnutím zkoušeného přípravku s jiným sklonem regresní přímky, než mají ostatní přípravky. V tomto případě by se měly počítat testovací statistiky t' zvlášť pro každý přípravek $\underline{U}$, ..., $\underline{Z}$:

$$t' = \frac{L_S - L_U}{2\sqrt{ns^2}} \quad . \qquad (3.2.4\text{-}1)$$

Tab. 3.2.4-I Tabulka kritických hodnot testu poměru rozptylů (F)

Stupně volnosti		f_1 v čitateli									
		1	2	3	4	5	6	7	8	20	∞
f_2 ve jmenovateli	12	4,75 (9,33)	3,89 (6,93)	3,49 (5,95)	3,26 (5,41)	3,11 (5,06)	3,00 (4,82)	2,91 (4,64)	2,85 (4,50)	2,54 (3,86)	2,30 (3,36)
	15	4,54 (8,68)	3,68 (6,36)	3,29 (5,42)	3,06 (4,89)	2,90 (4,56)	2,79 (4,32)	2,71 (4,14)	2,64 (4,00)	2,33 (3,37)	2,07 (2,87)
	20	4,35 (8,10)	3,49 (5,85)	3,10 (4,94)	2,87 (4,43)	2,71 (4,10)	2,60 (3,87)	2,51 (3,70)	2,45 (3,56)	2,12 (2,94)	1,84 (2,42)
	25	4,24 (7,77)	3,38 (5,57)	2,99 (4,68)	2,76 (4,18)	2,60 (3,86)	2,49 (3,63)	2,40 (3,46)	2,34 (3,32)	2,01 (2,70)	1,71 (2,17)
	30	4,17 (7,56)	3,32 (5,39)	2,92 (4,51)	2,69 (4,02)	2,53 (3,70)	2,42 (3,47)	2,33 (3,30)	2,27 (3,17)	1,93 (2,55)	1,62 (2,01)
	40	4,08 (7,31)	3,23 (5,18)	2,84 (4,31)	2,61 (3,83)	2,45 (3,51)	2,34 (3,29)	2,25 (3,12)	2,18 (2,99)	1,84 (2,37)	1.51 (1,80)
	60	4,00 (7,08)	3,15 (4,98)	2,76 (4,13)	2,53 (3,65)	2,37 (3,34)	2,25 (3,12)	2,17 (2,95)	2,10 (2,82)	1,75 (2,20)	1,39 (1,60)
	∞	3,84 (6,63)	3,00 (4,.61)	2,60 (3,78)	2,37 (3,32)	2,21 (3,02)	2,10 (2,80)	2,01 (2,64)	1,94 (2,51)	1,57 (1,88)	1,00 (1,00)

Při náhodné odchylce rozptylů s pravděpodobností překročení hodnoty tabelované na horním řádku 0,05 je pravděpodobnost nepřekročení této hodnoty 0,95. Pravděpodobnost překročení hodnoty v dolním řádku je rovna 0,01, takže s pravděpodobností 0,99 překročena nebude.

Pro čtyřdávkové zkoušky se t' počítá:

$$\frac{L_S - L_U}{2\sqrt{10ns^2}} \quad .$$

Každá vypočtená hodnota t' se porovná s kritickou hodnotou z tabulky 3.2.4-II, kde $f_1 = h$ -1 a f_2 je počet stupňů volnosti s^2. Pokud je některá z hodnot t' statisticky významná, je nutno příslušný přípravek vyloučit ze zkoušky a znovu vyhodnotit.

Ve zkouškách s neobvykle velkou reziduální chybou může být vysoká významnost F-statistiky způsobena špatným odhadem předpokládané účinnosti. Pokud je tomu tak, může se získaný odhad účinnosti použít k stanovení předpokládané účinnosti pro další zkoušky tohoto přípravku.

V testech rovnoběžnosti a linearity se může nahodile vyskytnout hodnota F menší než 1. Pokud se však objevuje opakovaně, ukazuje to na odchylku od předpokladů platnosti modelu, která by se měla později vyšetřit. Pokud je potvrzena platnost modelu, může být vypočtena účinnost a její meze spolehlivosti. Postup je popsán v následující kapitole.

Tab. 3.2.4-II Kritické hodnoty t' dvoustranného testu porovnání h - 1 přípravků a standardu

	$f_1 = (h - 1)$ = počet zkoušených přípravků								
f_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,94
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73
∞	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69

Dunnett, C. W.: Biometrics, 20, 1964, 482-491.

Při náhodné odchylce porovnávaných přípravků je pravděpodobnost překročení hodnoty tabelované na horním řádku rovna 0,05 a s pravděpodobností 0,95 tedy tato hodnota překročena nebude.

3.2.5 Odhad účinnosti a její meze spolehlivosti

Nejprve se vypočtou průměry odpovědí ($\bar{y}_S, \bar{y}_U, \ldots \bar{y}_Z$) pro každý přípravek:

$$\bar{y}_S = \frac{S}{N_S}, \qquad (3.2.5\text{-}1)$$

a podobně pro ostatní přípravky (viz graf 3.2.5-I).

Jestliže je I rozdíl logaritmů sousedních dávek každého přípravku, pak společný sklon (b) všech d-dávkových zkoušek je:

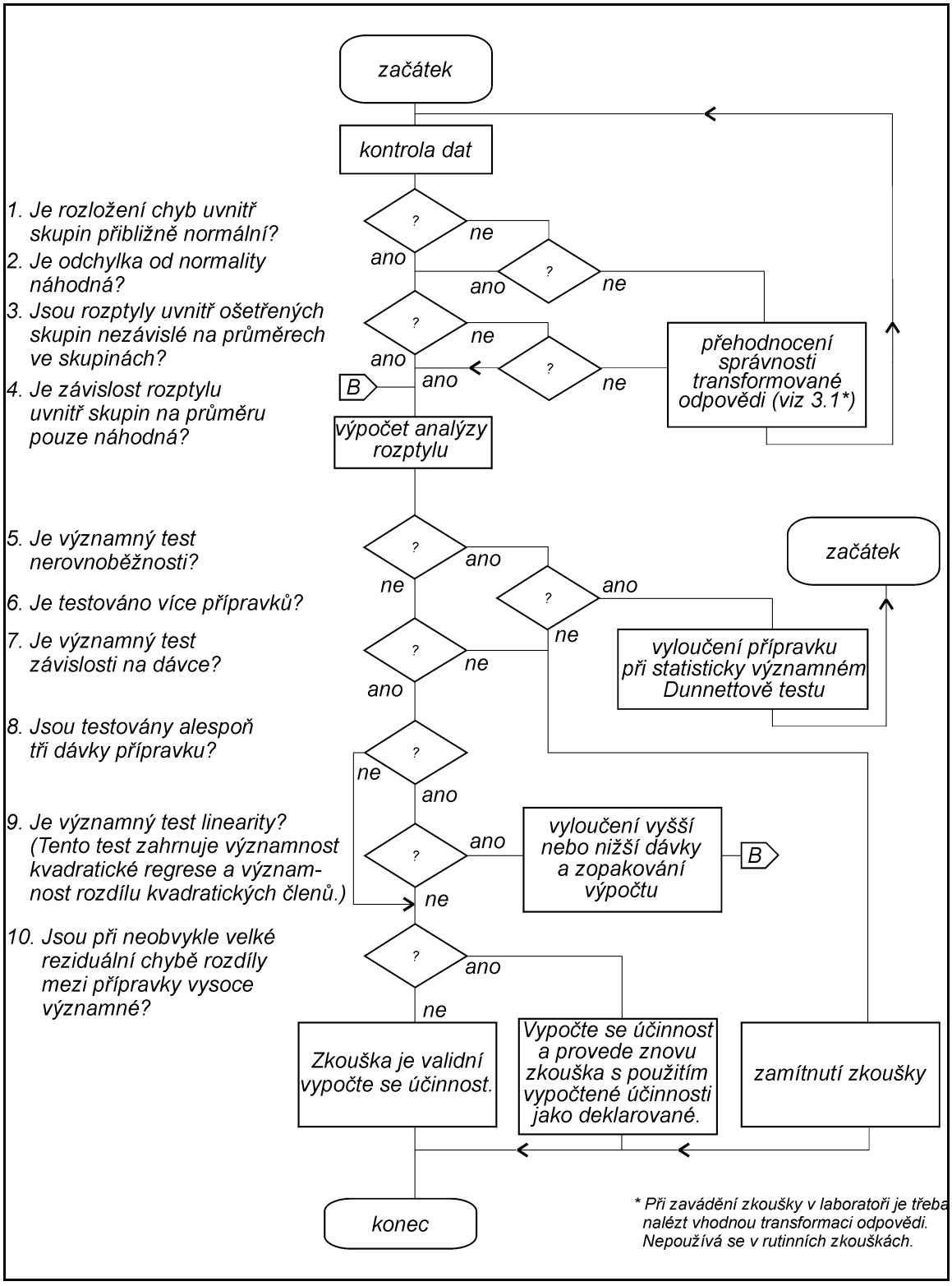
$$b = \frac{L_S + L_U + \ldots + L_Z}{(d - 1)Inh}. \qquad (3.2.5\text{-}2)$$

Pro čtyřdávkové zkoušky se b počítá:

$$b = \frac{L_S + L_U + \ldots + L_Z}{10Inh}.$$

Logaritmus relativní účinnosti R'_U zkoušeného přípravku U pak je:

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b}. \qquad (3.2.5\text{-}3)$$



Obr. 3.2.4-III Vývojový diagram testu validity rutinní zkoušky

Vývojový diagram ukazuje jednotlivé kroky analýzy výsledků zkoušky. Pokud se tento vývojový diagram použije pro vytvoření počítačového programu, musí být pro konečné rozhodnutí o přijetí, zamítnutí nebo modifikaci zkoušky vzaty v úvahu i výsledky jednotlivých kroků tohoto algoritmu.

Vypočtená účinnost je odhadem "skutečné účinnosti" zkoušeného přípravku. Interval spolehlivosti, který s 95% pravděpodobností obsahuje skutečnou hodnotu účinnosti, se vypočte jako antilogaritmus výrazu:

$$CM_U' \pm \frac{st\sqrt{C}}{b}\sqrt{\frac{1}{N_S}+\frac{1}{N_U}+\frac{(\bar{y}_S - \bar{y}_U)^2}{E - s^2t^2}} , \qquad (3.2.5\text{-}4)$$

kde:

$$C = \frac{E}{E - s^2t^2} , \qquad (3.2.5\text{-}5)$$

E se najde v tabulce 3.2.3-IV, s^2 je podíl reziduálního součtu čtverců (tabulka 3.2.3-V) a odpovídajícího počtu stupňů volnosti; t je kritická hodnota t-rozdělení z tabulky 6.1 se stejným počtem stupňů volnosti pro pravděpodobnost 0,95.

Pro vyvážené zkoušky se dá tento vzorec zjednodušit na:

$$CM_U' \pm \sqrt{(C - 1)(CM_U'^2 + 2H)} , \qquad (3.2.5\text{-}6)$$

kde:

$$H = \frac{E}{b^2dn} ,$$

C je míra významnosti regrese. Ve zkouškách s dobře vymezeným sklonem je hodnota C velmi blízká jedné. Záporná hodnota C indikuje statisticky nevýznamnou závislost.

Odhadovaná účinnost (R_U) a odpovídající meze spolehlivosti se vypočtou z hodnot získaných pomocí vzorců 3.2.5-3 a 3.2.5-6 buď vynásobením číslem A_u po odlogaritmování, nebo přičtením logaritmu A_u před odlogaritmováním. Na základě předpokládané účinnosti A se testuje shoda odpovědí na tři dávky u_1, u_2 a u_3 testovaného přípravku s odpovědí na příslušné dávky standardu s_1, s_2 a s_3. Protože je uvažována lineární závislost na logaritmu dávky, má osa dávek logaritmické měřítko.

Rozdíl logaritmů sousedních dávek I je konstantní:

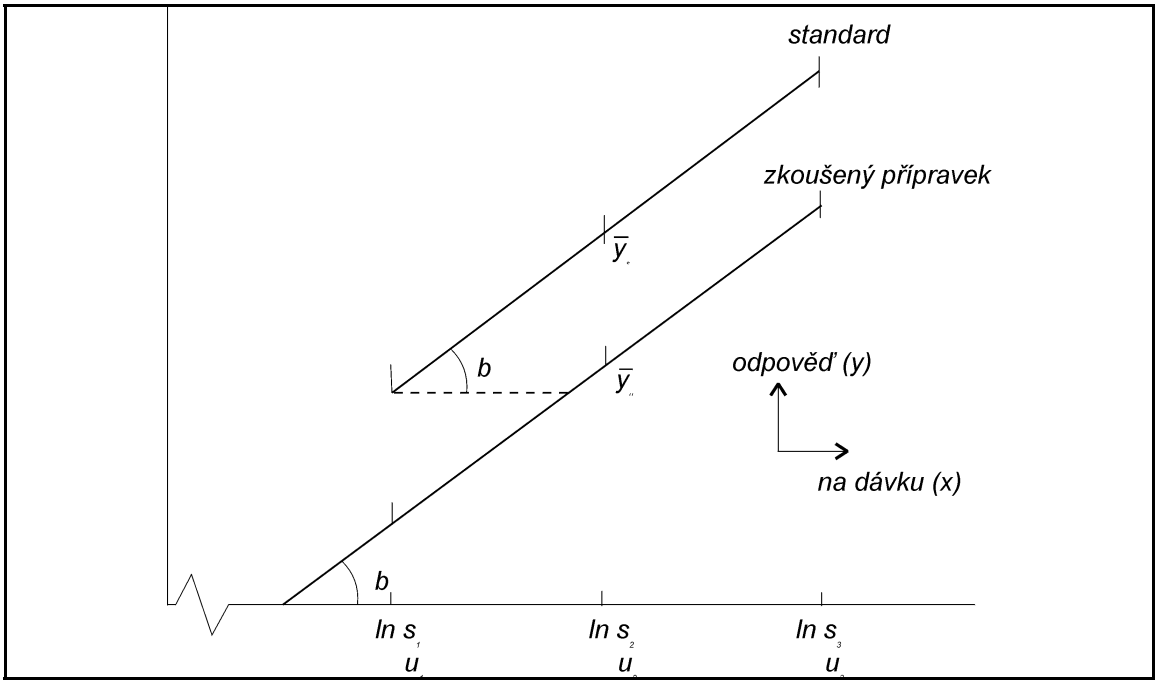
$$\ln s_2 - \ln s_1 = \ln s_3 - \ln s_2 ,$$

kde:

y_S - průměrná odpověď standardu,

y_U - průměrná odpověď neznámého přípravku.

Svislé úsečky představují rozmezí naměřených odpovědí na danou dávku, b je společný sklon rovnoběžných přímek proložených průměrnými hodnotami odpovědí standardu (y_S) a přípravku (y_U).



Obr. 3.2.5-I Model rovnoběžnosti pro trojdávkovou zkoušku 3 + 3

3.2.6 Chybějící hodnoty

Ve vyvážených zkouškách se může přihodit, že v souvislosti s ošetřením dojde ke ztrátě jedné nebo více odpovědí, například tak, že některá zvířata uhynou. Úplná statistická analýza je pak mnohem složitější. Nicméně pokud je prokazatelné, že výskyt chybějící hodnoty nijak nesouvisí s přidělením pokusných jednotek do jednotlivých skupin, může být zachována jednoduchost vyhodnocení vyváženého plánu experimentu tak, že se nahradí chybějící hodnota hodnotou vypočtenou na základě ostatních pozorovaných hodnot. Ztráta informace se pak vezme v úvahu zmenšením počtu stupňů volnosti celkového a reziduálního součtu čtverců o jeden a použitím vzorce pro výpočet chybějící hodnoty.

Pokud chybí více než jedno pozorování, může se použít stejný vzorec. Postup je takový, že se hrubě odhadnou všechny chybějící hodnoty kromě jedné, a ta se vypočte podle uvedeného vzorce ze všech ostatních hodnot, včetně těch hrubě odhadnutých. Vypočtená hodnota se vezme za pozorovanou a pokračuje se stejným postupem pro všechny další chybějící hodnoty. Po vypočtení všech chybějících hodnot tímto postupem se provede cyklus znovu od začátku, přičemž se místo hrubých odhadů použijí posledně vypočtené hodnoty pro všechny chybějící odpovědi. To vše se opakuje několikrát, až se získají ve dvou po sobě následujících cyklech stejné hodnoty. Konvergence tohoto postupu je obvykle rychlá.

Pokud je počet nahrazovaných hodnot relativně malý v porovnání s celkovým rozsahem zkoušky (řekněme menší než 5 %), je použitá aproximace chybějících hodnot a redukce stupňů volnosti o počet chybějících hodnot obvykle uspokojivá. Nicméně výsledky by se měly interpretovat velmi opatrně, obzvláště pokud chybějící hodnoty v některém ošetření nebo bloku převažují. Pak by měl biometr uvážit, zda nepůsobily v průběhu zkoušky nějaké další nežádoucí vlivy. Nahrazení chybějících hodnot ve zkoušce bez jejího opakování je vždy choulostivé.

Úplné znáhodnění

Při úplném znáhodnění se za odhad chybějící hodnoty bere aritmetický průměr všech ostatních odpovědí daného ošetření.

Plán náhodných bloků

Chybějící hodnota (y') se vypočte podle vzorce:

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)}, \qquad (3.2.6\text{-}1)$$

kde B' je součet odpovědí v bloku obsahujícím příslušné chybějící pozorování, T' součet odpovědí při příslušném ošetření a G' součet všech odpovědí ve zkoušce.

Jako příklad nechť chybí odpověď u_1 v prvém bloku zkoušky antibiotik (příklad 3.2.8.2).

B' = 1050
T' = 869
G' = 7189
y' = 174
k = 6
n = 6

Místo hodnoty 174 = u_1 v tabulce odpovědí se získá podle vzorce (3.2.6-1) odhad 173. Hodnocení zkoušky bude stejné jako v příkladu 3.2.8.2, ale počet stupňů volnosti pro reziduální chybu bude roven 24 a pro celkový součet čtverců 34.

Latinské čtverce

Chybějící hodnota (y') se nahradí podle vzorce:

$$y' = \frac{k(B' + C' + T') - 2G'}{(k-1)(k-2)}, \qquad (3.2.6\text{-}2)$$

kde B' a C' jsou součty odpovědí v řádce a sloupci s chybějícím pozorováním. V tomto případě je $k = n$. Když v příkladu 3.2.8.3 chybí hodnota 165 v sedmém sloupci a v šestém řádku, dostane se její odhad 169 podle vzorce (3.2.6-2) z hodnot:

B' = 1582
C' = 1663
T' = 1355
G' = 15956
k = 9

Stupně volnosti reziduální chyby budou redukovány na 55 a celkového součtu čtverců na 79.

Dvoudávková křížová zkouška

Když se chybějící pozorování vyskytne v dvoudávkové křížové zkoušce, je důležité konzultovat situaci se statistikem, protože vyhodnocení závisí na konkrétní kombinaci ošetření.

3.2.7 Částečně vyvážená zkouška

Liší-li se předpokládaná účinnost testovaného přípravku výrazně od skutečné účinnosti, může se stát, že nejvyšší dávka poskytuje již jen nejvyšší možnou odpověď, nebo naopak, že odpověď na nejnižší dávku je minimální možná. Tyto odpovědi neleží v lineární části regresní křivky, testy

validity indikují odchylku od linearity nebo nerovnoběžnost ve vztahu standardu a testovaného přípravku.

V daném případě se může odpověď na nejnižší nebo nejvyšší dávku ze zkoušky vyloučit. Ze zbývajících dat se vypočte provizorní odhad relativní účinnosti. Tento odhad účinnosti umožňuje vhodnější volbu dávek standardu a zkoušeného přípravku v nové zkoušce.

Logaritmus relativní účinnosti se získá ze vzorce:

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} \pm \frac{I}{2}, \qquad (3.2.7\text{-}1)$$

který je velmi podobný vzorci 3.2.5-3, pouze jedna polovina rozdílu logaritmů sousedních dávek se odčítá při vypuštění nejnižší dávky nebo přičítá při vypuštění dávky nejvyšší.

Průměrné odpovědi $\bar{y}_U$ a $\bar{y}_S$ se získají stejně jako v úplně vyvážené zkoušce (rovnice 3.2.5-1), ale vzhledem k plánu zkoušky je nutné poněkud modifikovat výpočet sklonu (b).

Ve vícenásobné zkoušce, původně se dvěma dávkami pro každý přípravek, se dají vypočítat všechny lineární kontrasty, (L_S...L_Z) s výjimkou kontrastu L_U. (Při vyloučení jedné z dávek u_1 nebo u_2 není možné vypočíst kontrast L_U).

Sklon se získá vypočtením průměru L a vydělením In:

$$b = \frac{L_S + \ldots + L_Z}{In(h - 1)}. \qquad (3.2.7\text{-}2)$$

Ve zkoušce pouze jednoho přípravku je:

$$b = \frac{L_S}{In}. \qquad (3.2.7\text{-}3)$$

Ve vícenásobných třídávkových zkouškách se získá L_U z tabulky 3.2.3-I a všechny ostatní lineární kontrasty z tabulky 3.2.3-II. Vzorec pro výpočet sklonu je:

$$b = \frac{2(L_S + \ldots + L_Z) + L_U}{In(4h - 3)}. \qquad (3.2.7\text{-}4)$$

Při testování pouze jediného přípravku se vzorec redukuje na:

$$b = \frac{2L_S + L_U}{5In}. \qquad (3.2.7\text{-}5)$$

3.2.8 Příklady

Příklady v této kapitole ilustrují použití vzorců vztahujících se k modelu rovnoběžnosti.

Příklady 3.2.8.1, 3.2.8.2 a 3.2.8.3 zahrnují dvou- a třídávkové zkoušky, včetně vícenásobných, a pokusné plány: úplně znáhodněný, náhodné bloky i latinské čtverce.

Příklad 3.2.8.4 ilustrující křížový dvoudávkový pokus obsahuje dosud nezavedené značení. Pro každou skupinu odpovědí ve zkoušce je zvlášť třeba vypočítat součet, lineární kontrasty a celkovou odpověď. Je potřebné znát i celkovou odpověď pro každého jedince. I když se v příkladu užívá označení den I a den II, není nutné provádět zkoušku ve dvou dnech. Podstatnou předností je, že efekt ošetření z první části křížové zkoušky se u každé pokusné jednotky vyloučí jejím ošetřením v druhé části zkoušky.

Příklad 3.2.8.1 popisuje použití Dunnettova testu validity v mnohonásobné zkoušce. Bartlettův test je použit v příkladech 3.2.8.1 a 3.2.8.3, Hartleyův test v příkladu 3.2.8.4.

Příklady mají ilustrovat především statistickou metodu výpočtů. Jejich cílem není výběr nejvhodnějšího z různých zkušebních plánů použitých v lékopisných článcích.

Při analýze provedené počítačem může větší počet desetinných míst způsobit malé odchylky ve výsledných hodnotách. Na konci některých příkladů jsou uvedeny takovéto přesnější výsledky. Odchylky ilustrují efekt zaokrouhlování.

Příklad 3.2.8.1 Dvoudávková vícenásobná zkouška úplně znáhodněná

Stanovení účinnosti kortikotropinu podkožním podáním krysám

Standard se podával v dávkách 0,25 a 1,0 jednotek na 100 g tělesné hmotnosti. Testovaly se dva přípravky, oba o předpokládané účinnosti 1 jednotka na miligram. Přípravky se tedy podávaly ve stejných dávkách jako standard. Průměry a rozptyly odpovědí ve všech ošetřovaných skupinách (tabulka 3.2.8.1-I) nenaznačují vzájemnou závislost.

Tab. 3.2.8.1-I Odpovědi *y*-množství kyseliny askorbové (mg) ve 100 g nadledvin

	Standard *S*		Přípravek *U*		Přípravek *Z*	
	s_1	s_2	u_1	u_2	z_1	z_2
	300	289	310	230	250	236
	310	221	290	210	268	213
	330	267	360	280	273	283
	290	236	341	261	240	269
	364	250	321	241	307	251
	328	231	370	290	270	294
	390	229	303	223	317	223
	360	269	334	254	312	250
	342	233	295	216	320	216
	306	259	315	235	265	265
průměr	332,0	248,4	323,9	244,0	282,2	250,0
rozptyl (var_i)	1026,7	483,8	725,0	718,7	854,6	784,7
ln rozptylu	6,9341	6,1817	6,5862	6,5774	6,7506	6,6653

Ověření normality rozložení je provedeno Shapiro-Wilk testem v nezávislých skupinách odpovědí.

Nejprve se vypočte hodnota *v* pro ošetření ve skupině S_1 (viz tabulka 3.2.8.1-II). Hodnoty *a*, *q* a *m* se najdou v tabulce 3.1.1-II pro $n = 10$:

$a = 0{,}366$
$q = -3{,}26$
$m = 1{,}47$

Dále se vypočte hodnota *V*:

$$V = \ln \frac{(v - a)}{(1 - v)} = \ln \frac{0{,}956 - 0{,}366}{1 - 0{,}956} = 2{,}60$$

a odtud $H = -3{,}26 + (1{,}47 \,.\, 2{,}60) = 0{,}56$.

Podobně se vypočtou hodnoty *H* pro ostatní ošetření (viz výsledky v tabulce 3.2.8.1-III).

Tab. 3.2.8.1-II Výpočet hodnoty v pro ošetření s_1 (n = 10)

Pořadí	Seřazené odpovědi y_i	Koeficient a_i (tab. 3.1.1-I)	Součin a_iy_i
1	290	-0,574	-166,46
2	300	-0,329	-98,70
3	306	-0,214	-65,48
4	310	-0,122	-37,82
5	328	-0,040	-13,12
6	330	+0,040	13,20
7	342	+0,122	41,72
8	360	+0,214	77,04
9	364	+0,329	119,76
10	390	+0,574	223,86
	průměr $(\bar{y})$ = 332,0	Součet Σa_iy_i = 94,00	
	$\Sigma(y_i - \bar{y})^2 = 9240,00$ $s^2 = \sum \frac{(y_i - \bar{y})^2}{n-1} = 1026,67$	$v = \frac{(\Sigma a_iy_i)^2}{\Sigma(y_i - \bar{y})^2} = \frac{8836,00}{9240,00} = 0,956$	

Tab. 3.2.8.1-III Výpočet hodnot H pro všechna ošetření (n = 10)

	s_1	s_2	u_1	u_2	z_1	z_2
Σa_iy_i	94,00	63,63	78,60	78,28	82,90	81,96
$\Sigma(y_i - \bar{y})^2$	9240,00	4354,40	6524,90	6468,00	7991,60	7062,00
v	0,956	0,930	0,947	0,947	0,893	0,951
V	2,60	2,09	2,39	2,39	1,59	2,48
H	0,56	-0,19	0,25	0,25	-0,92	0,39

Pro data z tabulky 3.2.8.1-III se vypočte testovací statistika:

$$t = \frac{0,56 - 0,19 + \ldots + 0,39}{\sqrt{6}} = \frac{0,34}{2,45} = 0,14 \ .$$

Porovnání vypočtené hodnoty s kritickou hodnotou v tabulce 6.1 (t = 1,96) na hladině významnosti 0,95 ukazuje, že data nejsou v rozporu s nulovou hypotézou normality.

Pokud provedeme analýzu pomocí počítačového programu, získáme hodnoty:

$$t = 0,153 \qquad \Sigma H = 0,375 \ .$$

Bartlettův test neprokázal ani nehomogennost rozptylů.

Testovací statistika pro k skupin rozptylů o f stupních volnosti se vypočte podle vzorce:

$$\chi^2 = \frac{3kf^2\left[k \ln\left(\frac{\Sigma var_i}{k}\right) - \Sigma \ln var_i\right]}{3kf + k + 1} \ .$$

Pro $k = 6$ a $f = 9$ vyjde:

$$\chi^2 = \frac{1458}{169}(6 \ln 765{,}58 - 39{,}6953) = 1{,}28 \ .$$

Tato hodnota je menší než kritická hodnota 11,07 z tabulky 5.4.2-I pro $P = 0{,}95$ a $(k - 1) = 5$ stupňů volnosti.

Tab. 3.2.8.1-IV Součty odpovědí a kontrasty (viz tabulka 3.2.3-I)

	Standard S	Přípravek U	Přípravek Z	Součet
nízká dávka	$S_1 = 3320$	$U_1 = 3239$	$Z_1 = 2822$	
vysoká dávka	$S_2 = 2484$	$U_2 = 2440$	$Z_2 = 2500$	
přípravek celkem	$S = 5804$	$U = 5679$	$Z = 5322$	$\Sigma y = 16805$
lineární kontrast	$L_S = -836$	$L_U = -799$	$L_Z = -322$	$\Sigma L = -1957$

Tab. 3.2.8.1-V Analýza rozptylu

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F	P
přípravky	2	6256,6	3128,3		
regrese	1	63 830,8	63 830,8	83,4	< 0,01
nerovnoběžnost	2	8218,2	4109,1	5,4	< 0,01
ošetření	5	78 305,7			
reziduální chyba	54	41 340,9	765,6		
součet	59	119 646,6			

Korekční člen K:

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{16805^2}{60} = 4\ 706\ 800{,}42; \ \Sigma y^2 = 4\ 826\ 447 \ .$$

Hodnoty součtů čtverců se získají z dat v tabulce 3.2.8.1-IV pomocí vzorců z tabulek 3.2.3-IV a 3.2.3-V.

$$\text{Přípravky} = \frac{S^2 + U^2 + Z^2}{20} - K = 6\ 256{,}63$$

$$\text{Regrese} = \frac{(L_S + L_U + L_Z)^2}{60} = 63\ 830{,}87 = E$$

$$\text{Nerovnoběžnost} = \frac{L_S^2 + L_U^2 + L_Z^2}{20} - E = 8\ 218{,}233$$

$$\text{Ošetření} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2 + Z_1^2 + Z_2^2}{10} - K = 78\ 305{,}68$$

$$\text{Celkový} = \Sigma y^2 - K = 119\ 646{,}58$$

Reziduální chyba = Celkový - Ošetření = 41 340,90

Validita zkoušky

Výpočty potvrzují významnou regresi (závislost na dávce). Hodnota $F = 83{,}4$ pro regresi je mnohem větší než interpolovaná kritická hodnota z tabulky 3.2.4-I pro $P = 0{,}01$, $f_1 = 1$ a $f_2 = 54$.

Odchylka od rovnoběžnosti je však také statisticky významná ($P < 0{,}05$). Vypočtená hodnota $F = 5{,}4$. Při podrobnějším prohlédnutí lineárních kontrastů v tabulce 3.2.8.1.-IV je zřejmé, že lineární kontrast $\underline{Z}$ je menší než kontrasty $\underline{S}$ a $\underline{U}$. Tuto domněnku lze potvrdit Dunnettovým testem:

$$t' = \frac{L_S - L_P}{2\sqrt{ns^2}} ,$$

kde s^2 = reziduální rozptyl, tj. 765,6, a L_P je lineární kontrast testovaného přípravku P.

Pro přípravek P = $\underline{U}$:

$$t' = \frac{-836 - (-799)}{2\sqrt{10 \,.\, 765{,}6}} = \frac{-37}{175{,}0} = -0{,}21 \ .$$

Pro přípravek P = $\underline{Z}$:

$$t' = \frac{-836 - (-322)}{2\sqrt{10 \,.\, 765{,}6}} = \frac{-514}{175{,}0} = -2{,}94 \ .$$

Z tabulky 3.2.4-II je kritická hodnota $t' = 2{,}27$ pro $P = 0{,}05$ s $f_1 = 2$ a $f_2 = 54$ (f_1 = počet testovaných přípravků).

Z těchto důvodů se pro nerovnoběžnost se standardem vyloučí přípravek $\underline{Z}$. Výpočet se tedy provede znovu pouze pro přípravek $\underline{U}$ a standard ($\Sigma y = 11\,486$; $\Sigma L = -1635$).

Tab. 3.2.8.1-VI Analýza rozptylu s vyloučením dat o přípravku $\underline{Z}$

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	*F*	*P*
přípravky	1	390,6	390,6		
regrese	1	66 830,60	66 830,6	90,5	< 0,01
nerovnoběžnost	1	34,2	34,2	0,05	> 0,05
ošetření	3	67 255,5			
reziduální chyba	36	26 587,3	738,5		
součet	39	93 842,8			

Korekční člen *K*:

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{11483^2}{40} = 3\,296\,482{,}225 \ ;$$

$$\Sigma y^2 = 3\,39^{0\,325} \ .$$

Výsledky analýzy rozptylu ukazují, že zkouška s vynecháním přípravku $\underline{Z}$ je validní z pohledu závislosti na dávce a rovnoběžnosti.

Výpočet účinnosti a jejích mezí spolehlivosti

Po vyloučení přípravku $\underline{Z}$ se vypočte pouze jedna účinnost.

$$\bar{y}_S = \frac{S}{N_S} = \frac{5804}{20} = 290{,}2$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{N_U} = 283{,}95$$

Podíl sousedních dávek je 4,0 a je tedy $I = \ln 4 = 1{,}3863$, z tabulky 6.1 je $t = 2{,}03$ pro 36 stupňů volnosti a pravděpodobnost $P = 0{,}95$.

$$b = \frac{L_S + L_U}{Inh} = \frac{-1635}{20I} = -58{,}970$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}1060 = \text{logaritmus relativní účinnosti přípravku } \underline{U}.$$

$$M_U = M'_U + \ln \text{ (deklarovaná účinnost přípravku } \underline{U}).$$

Protože přípravek byl deklarován jako 1 jednotka na miligram,

$$M_U = M'_U + 0 = 0{,}1060 \ .$$

Účinnost získáme odlogaritmováním M_U, je tedy $M_U = 1{,}11$ jednotek na miligram.

$$C = \frac{E}{E - s^2t^2} = \frac{66830{,}6}{66830{,}6 - 738{,}5t^2} = 1{,}0477$$

$$H = \frac{E}{b^2dn} = \frac{66\,830{,}6}{(-58{,}970)^2 \ . \ 2 \ . \ 10} = 0{,}9609108$$

$$(C - 1)(CM'^2_U + 2H) = 0{,}0477(0{,}01177 + 1{,}9218) = 0{,}09223$$

ln (meze spolehlivosti) vypočteme:

$$\ln \text{ (deklarovaná účinnost přípravku } \underline{U}) + CM'_U \pm \sqrt{0{,}09223} = 0 + 0{,}1110 \pm 0{,}3037 \ .$$

Meze spolehlivosti jsou tedy od 0,82 do 1,51 jednotek na miligram.

Příklad 3.2.8.2 Třídávková metoda s náhodnými bloky bez opakování

Stanovení účinnosti antibiotik na Petriho miskách

Standardní přípravek se aplikoval v dávkách 2, 4 a 8 jednotek. Na základě deklarované účinnosti $A_U = 1500$ jednotek na mililitr byly připraveny odpovídající dávky přípravku $\underline{U}$. Všech šest ošetření bylo najednou aplikováno na každou misku. Rozptyl všech ošetření (tabulka 3.2.8.2-I) nejeví závislost na příslušných průměrech. Není tedy důvod pochybovat o splnění podmínky 2 z kapitoly 3.1.

Tab. 3.2.8.2-I Odpovědi *y:* průměry inhibiční zóny (mm . 10)

	Standard *S*			Přípravek *U*			Součet v bloku
miska	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	
1	176	205	235	174	202	232	$R_1 = 1224$
2	178	208	238	175	206	234	$R_2 = 1239$
3	178	207	237	177	203	236	$R_3 = 1238$
4	175	205	235	173	201	232	$R_4 = 1221$
5	176	206	235	174	204	231	$R_5 = 1226$
6	174	204	236	170	202	229	$R_6 = 1215$
průměr	176,2	205,8	236,0	173,8	203,0	232,3	
rozptyl	2,6	2,2	1,6	5,4	3,2	5,9	

Tab. 3.2.8.2-II Součty a kontrasty odpovědí (viz tabulka 3.2.3-II)

	Standard *S*	Přípravek *U*	Součet
nízká dávka	$S_1 = 1057$	$U_1 = 1043$	
střední dávka	$S_2 = 1235$	$U_2 = 1218$	
vysoká dávka	$S_3 = 1416$	$U_3 = 1394$	
přípravek celkem	$S = 3708$	$U = 3655$	$\Sigma y = 7363$
lineární kontrast	$L_S = 359$	$L_U = 351$	$\Sigma L = 710$
kvadratický kontrast	$Q_S = 3$	$Q_U = 1$	$\Sigma Q = 4$

Tab. 3.2.8.2-III Analýza rozptylu

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	*F*	*P*
přípravky	1	78,03	78,03		
regrese	1	21 004,17	21 004,17	18 737	< 0,01
nerovnoběžnost	1	2,67	2,67	2,4	> 0,05
kvadratická regerese	1	0,22	0,22	0,2	> 0,05
odchylka kvadratických členů	1	0,06	0,06	0,05	> 0,05
	5	21 085,14			
ošetření	5	75,80	15,16	13,5	< 0,01
bloky (misky)	25	28,03	1,121		
reziduální chyba	35	21 188,97			
součet					

Korekční člen *K*:

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{7363^2}{36} = 1\,505\,938{,}03;\ \Sigma y^2 = 1\,527\,127\ .$$

Hodnoty pro součty čtverců se získají z tabulky 3.2.8.2-II pomocí vzorců v tabulkách 3.2.3-IV a 3.2.3-V.

Přípravky $= \dfrac{S^2 + U^2}{18} - K = 78{,}026$

Lineární regrese $= \dfrac{(L_S + L_U)^2}{24} = 21\,004{,}167 = E$

Nerovnoběžnost $= \dfrac{L_S^2 + L_U^2}{12} - E = 2{,}666$

Kvadratická regrese $= \dfrac{(Q_S + Q_U)^2}{72} = 0{,}222 = Q$

Odchylka kvadratických členů $= \dfrac{Q_S^2 + Q_U^2}{36} - Q = 0{,}056$

Ošetření $= \dfrac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{6} - K = 21\,085{,}137$

Bloky $= \dfrac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{6} - K = 75{,}803$

Celkový $= \Sigma y^2 - K = 21\,188{,}97$

Reziduální = Celkový - Ošetření - Bloky = 28,03

Výsledky analýzy prokazují významnost ($P < 0{,}01$) rozdílu mezi jednotlivými Petriho miskami, a tedy užitečnost použití tohoto plánu experimentu. Pokud by ošetření byla rozdělena na misky náhodně, pak by rozdíly odpovědí na jednotlivých miskách způsobily zvětšení reziduálního rozptylu s^2, což by vedlo k širším mezím spolehlivosti.

Validita zkoušky

Významnost regrese ($P < 0{,}01$) a nevýznamnost ($P < 0{,}05$) nelinearity i odchylky od rovnoběžnosti potvrzují, že zkouška je validní, což umožňuje výpočet účinnosti přípravku $\underline{U}$ a jejích mezí spolehlivosti. Testování validity je uvedeno v kapitole 3.2.4.

Výpočet účinnosti a mezí spolehlivosti

$$\bar{y}_U - \bar{y}_S = \frac{U - S}{3n} = \frac{-53}{18}$$

Podíl sousedních dávek byl 2,0, takže:

$$I = \ln 2 = 0{,}69315 \ .$$

Podle tabulky 6.1 je $t = 2{,}06$ pro 25 stupňů volnosti a pravděpodobnost $P = 0{,}95$.

$$b = \frac{L_S + L_U}{2Inh} = \frac{710}{24I} = 42{,}6797$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = -0{,}0690$$

Logaritmus relativní účinnosti přípravku $\underline{U}$ je tedy:

$$M = M' + \ln A_U = -0{,}0690 + \ln 1500 = 7{,}2442 \ .$$

Odhad účinnosti získaný odlogaritmováním M je tedy 1400 jednotek na mililitr:

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{21004{,}17}{21004{,}17 - 1{,}121\, t^2} = 1{,}0002 \ ,$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{21\,004{,}17}{42{,}6797^2 \ . \ 3 \ . \ 6} = 0{,}640605 \ ,$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = 0{,}0002(0{,}00476 + 1{,}28121) = 0{,}00026 \ .$$

Logaritmy mezí spolehlivosti se vypočtou jako:

$$\ln A_U + CM' \pm \sqrt{0{,}000026} = 7{,}2442 \pm 0{,}0160 \ .$$

Meze spolehlivosti jsou tedy 1378 až 1423 jednotek na mililitr.
Po vyhodnocení pomocí počítačového programu se obdrží hodnoty:

$$C = 1{,}000227$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = 0{,}00029128 \ .$$

Meze spolehlivosti jsou 1376,3 - 1424,1 jednotek na mililitr.

Příklad 3.2.8.3 Třídávková vícenásobná zkouška latinskými čtverci bez opakování

Zkouška antibiotik na pravoúhlé plotně

Standardní přípravek se aplikoval v dávkách 3, 6 a 12 jednotek. Na základě předpokládané účinnosti přípravků $\underline{U}$ a $\underline{Z}$, $A_U = 2000$ a $A_Z = 2500$ jednotek byly připraveny ekvivalentní dávky těchto přípravků. Všech devět ošetření bylo aplikováno jednou v každém sloupci a každém řádku.

Tab. 3.2.8.3-I Uspořádání ošetření na políčkách plotny (latinský čtverec)

	Sloupce								
Řádky	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	u_1	z_1	u_2	s_2	z_2	z_3	u_3	s_1	s_3
2	s_2	u_3	u_1	z_3	s_1	u_2	s_3	z_1	z_2
3	s_1	s_2	u_3	u_1	z_1	z_2	z_3	s_3	u_2
4	z_2	s_3	s_1	z_1	u_3	u_1	u_2	s_2	z_3
5	z_3	z_2	s_2	s_1	u_2	s_3	z_1	u_3	u_1
6	u_2	z_3	s_3	z_2	s_2	u_3	s_1	u_1	z_1
7	z_1	u_2	z_2	u_3	s_3	s_1	u_1	z_3	s_2
8	s_3	s_1	z_3	u_2	u_1	z_1	s_2	z_2	u_3
9	u_3	u_1	z_1	s_3	z_3	s_2	z_2	u_2	s_1

Tab. 3.2.8.3-II Odpovědi *y:* průměr inhibiční zóny (mm . 10)

	Sloupce									
Řádky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	řádkové součty
1	164	171	194	206	211	237	237	172	224	$R_1 = 1816$
2	188	224	178	236	180	210	237	180	210	$R_2 = 1843$
3	168	203	230	175	175	209	236	238	207	$R_3 = 1841$
4	182	214	162	175	227	171	194	201	225	$R_4 = 1751$
5	220	186	192	169	205	230	169	237	167	$R_5 = 1775$
6	183	217	223	200	195	228	165	171	165	$R_6 = 1747$
7	163	195	203	229	230	175	179	233	196	$R_7 = 1803$
8	218	163	228	200	167	175	207	199	233	$R_8 = 1790$
9	218	163	162	216	233	194	204	199	166	$R_9 = 1755$
sloupcové součty	$C_1 =$ 1704	$C_2 =$ 1736	$C_3 =$ 1772	$C_4 =$ 1806	$C_5 =$ 1823	$C_6 =$ 1829	$C_7 =$ 1828	$C_8 =$ 1830	$C_9 =$ 1793	

Tab. 3.2.8.3-III Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky

	Standard *S*			Přípravek *U*			Přípravek *Z*		
	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	z_1	z_2	z_3
průměr ošetření	168,9	198,0	225,6	170,6	198,6	229,2	170,6	200,4	229,4
rozptyl (var_i)	34,61	43,00	77,03	34,03	67,78	36,94	39,03	105,78	54,28
ln (vari)	3,5442	3,7612	4,3442	3,5272	4,2162	3,6094	3,6643	4,6613	3,9942

$$\sum \mathrm{var}_i = 492{,}48$$
$$\sum \ln \mathrm{var}_i = 35{,}3222$$

Bartlettův test neprokázal statisticky významnou odchylku heterogenity rozptylů (i když je nutno si uvědomit, že tento test je použitelný, přísně vzato, pouze pro plně znáhodněný plán experimentu).

Pro skupinu *k* rozptylů, každý s *f* stupni volnosti, test představuje výpočet:

$$\chi^2 = \frac{3kf^2\left[k \ln\left(\frac{\sum var_i}{k}\right) - \sum \ln var_i\right]}{3kf + k + 1} .$$

To se pro $k = 9$, $f = 8$ redukuje na:

$$\chi^2 = \frac{1728}{226}(9\ln 54{,}72 - 35{,}3222) = 5{,}34 .$$

Tato hodnota je menší než kritická hodnota (15,51) z tabulky 6.2 pro (k - 1) stupňů volnosti a pravděpodobnost $P = 0{,}95$.

Tab. 3.2.8.3-IV Součty odpovědí a kontrasty

	Standard S	Přípravek U	Přípravek Z	Součet
nízká dávka	$S_1 = 1520$	$U_1 = 1535$	$Z_1 = 1535$	
střední dávka	$S_2 = 1782$	$U_2 = 1787$	$Z_2 = 1804$	
vysoká dávka	$S_3 = 2030$	$U_3 = 2063$	$Z_3 = 2065$	
přípravek celkem	$S = 5332$	$U = 5385$	$Z = 5404$	$\Sigma y = 16\,121$
lineární kontrast	$L_S = 510$	$L_U = 528$	$L_Z = 530$	$\Sigma L = 1568$
kvadratický kontrast	$Q_S = -14$	$Q_U = 24$	$Q_Z = -8$	$\Sigma Q = 2$

Tab. 3.2.8.3-V Analýza rozptylu

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F	P
přípravky	2	103,14	51,57		
lineární regrese	1	45 530,07	45 530,07	2921	< 0,01
nerovnoběžnost	2	13,49	6,75	0,43	> 0,05
kvadratická regerese	1	0,02	0,02	0,00	> 0,05
odchylka kvadratických členů	2	15,46	7,73	0,50	> 0,05
ošetření (celkem)	8	45 662,17			
řádky	8	1229,06	153,63	9,86	< 0,01
sloupce	8	1837,95	229,74	14,74	< 0,01
reziduální chyba	56	872,77	15,585		
celkem	80	49 601,95			

Hodnoty pro součty čtverců se získají z tabulek 3.2.8.3-II a 3.2.8.3-IV pomocí vzorců v tabulkách 3.2.3-IV a 3.2.3-V.

Korekční člen $K = \dfrac{(\Sigma y)^2}{N} = \dfrac{16\,121^2}{81} = 3\,208\,477{,}05;\ \Sigma y^2 = 3\,258\,079$

Přípravky $= \dfrac{S^2 + U^2 + Z^2}{27} - K = 103{,}135$

Lineární regrese $= \dfrac{(L_S + L_U + L_Z)^2}{54} = 45\,530{,}07 = E$

Nerovnoběžnost $= \dfrac{L_S^2 + L_U^2 + L_Z^2}{18} - E = 13{,}486$

Kvadratická regrese $= \dfrac{(Q_S + Q_U + Q_Z)^2}{162} = 0{,}0247 = Q$

Odchylka kvadratických členů $= \dfrac{Q_S^2 + Q_U^2 + Q_Z^2}{54} - Q = 15{,}457$

$$\text{Ošetření} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \ldots + Z_3^2}{9} - K = 45\,662{,}17$$

$$\text{Řádky} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + \ldots + R_9^2}{9} - K = 1229{,}06$$

$$\text{Sloupce} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + \ldots + C_9^2}{9} - K = 1837{,}95$$

$$\text{Celkem} = \Sigma y^2 - K = 49601{,}95$$

Reziduální chyba = Celkem - Ošetření - Řádky - Sloupce = 872,77

Analýza prokazuje statisticky významné ($P < 0{,}01$) rozdíly mezi řádky a mezi sloupci na plotně. Tato skutečnost ukazuje přednost plánu latinských čtverců před plně znáhodněným plánem.

Validita zkoušky

Silná významnost regrese ($P < 0{,}01$) a nevýznamnost nelinearity i odchylky od rovnoběžnosti potvrzují, že zkouška je validní, což umožňuje výpočet účinnosti přípravku.

Výpočet účinnosti a mezí spolehlivosti

Podíl sousedních dávek je 2,0, takže $I = \ln 2 = 0{,}69315$.

Podle tabulky 6.1 je $t = 2{,}00$ pro 56 stupňů volnosti a pravděpodobnost $P = 0{,}95$.

$$\bar{y}_S = \frac{S}{27}, \qquad \bar{y}_U = \frac{U}{27}, \qquad \bar{y}_Z = \frac{Z}{27},$$

$$b = \frac{L_S + L_U + L_Z}{2Inh} = \frac{1568}{54I} = 41{,}891 .$$

$$M_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}04686 \quad = \text{logaritmus relativní účinnosti přípravku } \underline{\text{U}}$$

$$M_U = \ln A_U + M_U' = \ln 2000 + 0{,}04686 = 7{,}6478$$

Odhad účinnosti, získaný odlogaritmováním M_U, je tedy 2096 jednotek na mililitr.

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{45\,530{,}07}{45\,530{,}07 - 15{,}585 t^2} = 1{,}0014$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{45\,530{,}07}{41{,}891^2 \,.\, 3 \,.\, 9} = 0{,}96093$$

$$(C - 1)(CM_U'^2 + 2H) = 0{,}0014(0{,}00220 + 1{,}92186) = 0{,}00269$$

Logaritmy mezí spolehlivosti se vypočtou jako:

$$\ln A_U + CM_U' \pm \sqrt{0{,}00269} = 7{,}6478 \pm 0{,}0519 \ .$$

Meze spolehlivosti jsou tedy 1990 až 2208 jednotek na mililitr.

Užitím stejného postupu pro přípravek $\underline{Z}$ se dostane:

$$M_Z' = 0{,}06366;\ M_Z = 7{,}8877 \ .$$

Odhad účinnosti je 2664 jednotek na mililitr.

$$(C - 1)(CM_Z'^2 + 2H) = 0{,}00270$$

Logaritmy mezí spolehlivosti jsou 7,8878 ± 0,0520.

Meze spolehlivosti jsou tedy 2530 až 2807 jednotek na mililitr.

Poznámka: Vyloučí-li se jeden přípravek z vícenásobné zkoušky uspořádané do latinského čtverce, je nutné zbytek analyzovat jako náhodné bloky.

Příklad 3.2.8.4 Dvoudávková křížová zkouška

Stanovení účinnosti insulinu na králících podkožním podáním

Standardní přípravek se aplikoval v dávkách 1 a 2 jednotky na mililitr. Na základě označené účinnosti neznámého přípravku (A_U= 40 jednotek na mililitr) byly připraveny ekvivalentní dávky přípravku. Jednotliví králíci obdrželi podkožně 0,5 ml odpovídajícího ředění podle plánu v tabulce 3.2.8.4-I. Výsledné odpovědi jsou v tabulce 3.2.8.4-II. Velký rozptyl, který je zřejmě způsoben variabilitou mezi jednotlivými zvířaty, ilustruje užitečnost křížového pokusu.

Tab. 3.2.8.4-I Uspořádání ošetření

	Skupina králíků			
	1	2	3	4
den I	s_1	s_2	u_1	u_2
den II	u_2	u_1	s_2	s_1

Tab. 3.2.8.4-II Odpovědi *y:* součty hodnot glukosy v krvi (mg/100ml) po 1 a 2 1/2 h

	Skupina 1			Skupina 2			Skupina 3			Skupina 4		
	s_1	u_2	Σ	s_2	u_1	Σ	u_1	s_2	Σ	u_2	s_1	Σ
	112	104	216	65	72	137	105	91	196	118	144	262
	126	112	238	116	160	276	83	67	150	119	149	268
	62	58	120	73	72	145	125	67	192	42	51	93
	86	63	149	47	93	140	56	45	101	64	107	171
	52	53	105	88	113	201	92	84	176	93	117	210
	110	113	223	63	71	134	101	56	157	73	128	201
	116	91	207	50	65	115	66	55	121	39	87	126
	101	68	169	55	100	155	91	68	159	31	71	102
průměr	95,6	82,8		69,6	93,3		89,9	66,6		72,4	106,8	
rozptyl	709,7	627,9		525,1	1012,5		479,6	230,6		1214,3	1215,1	

Hartleyovým testem nebyla nalezena významná neshoda rozptylů.

Test spočívá ve výpočtu statistiky: největší odhad rozptylu/nejmenší odhad rozptylu. Tento podíl (1215,1/230,6 = 5,3) je menší než kritická hodnota 12,7 z tabulky 3.2.1-I pro $P = 0{,}05$ osm rozptylů, každý se sedmi stupni volnosti. Hartleyův test je jednodušší než Bartlettův a vyžaduje pouze výpočet jediného podílu. Ve většině případů je pro test heterogenity rozptylů postačující. Pro tato data dává Bartlettův test hodnotu testovací statistiky 6,4 při odpovídající kritické hodnotě 14,1.

Součty odpovědí a lineární kontrasty byly vypočteny odděleně pro každý den zkoušky. Výsledky jsou v tabulce 3.2.8.4-III.

Tab. 3.2.8.4-III Součty odpovědí a kontrasty

	Standard S	Přípravek U	Součet
Den I			
nízká dávka	$S_{1I} = 765$	$U_{1I} = 719$	
vysoká dávka	$S_{2I} = 557$	$U_{2I} = 579$	
součet	$S_I = 1322$	$U_I = 1298$	$D_I = 2620$
Den II			
nízká dávka	$S_{1II} = 854$	$U_{1II} = 746$	
vysoká dávka	$S_{2II} = 533$	$U_{2II} = 662$	
součet	$S_I = 1387$	$U_I = 1408$	$D_{II} = 2795$
Přípravky celkem	$S = 2709$	$U = 2706$	$\Sigma y = 5415$
Lineární kontrasty			
den I	$L_{SI} = -208$	$L_{UI} = -140$	$L_I = -348$
den II	$L_{SII} = -321$	$L_{UII} = -84$	$L_{II} = -405$
celkem	$L_S = -529$	$L_U = -224$	$\Sigma_L = -753$

Analýza rozptylu pro tento plán experimentu je složitější než pro jiné plány, protože složka součtu čtverců tvořená odchylkou od rovnoběžnosti není nezávislá na složce tvořené rozdíly mezi králíky. Test rovnoběžnosti regresních přímek vyžaduje výpočet dalšího reziduálního součtu čtverců "uvnitř králíků", který se získá odečtením složky rovnoběžnosti a dvou "interakcí" od složky mezi králíky.

Díky opakování v každé skupině obsahuje analýza tři "interakce":

dny x přípravky, dny x regrese, dny x rovnoběžnost.

Tyto členy reprezentují náchylnost jednotlivých složek (efektu přípravku, regrese a rovnoběžnosti) měnit se den ode dne. Odpovídající F-test kontroluje platnost modelu se zřetelem na tuto skutečnost. Statisticky významné výsledky F-testu je třeba interpretovat opatrně, a pokud je to možné, zkoušku zopakovat.

Tab. 3.2.8.4-IV Analýza rozptylu

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	*F*	*P*
nerovnoběžnost	1	1453,5	1453,5	1,06	> 0,05
dny x přípravky	1	31,6	31,6	0,02	> 0,05
dny x regrese	1	50,8	50,8	0,04	> 0,05
reziduální chyba mezi králíky	28	38 258,8	1366,4		
bloky (králíci)	31	39 794,7	1283,7		
přípravky	1	0,1	0,1	0,00	> 0,05
regrese	1	8859,5	8859,5	64,5	< 0,01
dny	1	478,5	478,5	3,48	> 0,05
dny x nerovnoběžnost	1	446,3	446,3	3,25	> 0,05
reziduální chyba "uvnitř" králíků	28	3844,1	137,3		
součet	63	53 423,2			

Korekční člen $K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{5415^2}{64} = 458\,159{,}77$; mm

$$\Sigma y^2 = 511\,583 \ .$$

Hodnoty součtu čtverců se získají z tabulky a 3.2.8.4-III pomocí vzorců v tabulce 3.2.3-IV. V této zkoušce je celkový počet odpovědí na každé ošetření v obou dnech $n = 16$.

Přípravky $= \frac{S^2 + U^2}{32} - K = 0{,}14$,

Regrese $= \frac{(L_S + L_U)^2}{64} = 8859{,}52 = E$,

Nerovnoběžnost $= \frac{L_S^2 + L_U^2}{32} - E = 1453{,}51$,

Bloky $= \frac{\Sigma B_i^2}{2} - K = 39\,794{,}73$,

kde B_i je celková odpověď králíka z tabulky 3.2.8.4-II.

Dny $= \frac{D_I^2 + D_{II}^2}{32} - K = 478{,}51$,

kde D_I a D_{II} jsou celkové odpovědi pro každý den.

Dny x Přípravky $= \frac{(S_I - S_{II} - U_I + U_{II})^2}{N} = 31{,}64$,

Dny x Regrese $= \frac{(L_{SII} - L_{SI} + L_{UII} - L_{UI})^2}{N} = 50{,}77$,

$$\text{Dny x Nerovnoběžnost} = \frac{(L_{SII} - L_{SI} - L_{UII} + L_{UI})^2}{N} = 446{,}27 \ ,$$

$$\text{Celkem} = \Sigma y^2 - K = 53\,423{,}23 \ .$$

Reziduální chyba mezi králíky = Bloky - Nerovnoběžnost - (Dny x Přípravky) - (Dny x x Regrese) = 38 258,81.

Reziduální chyba "uvnitř" králíků = Celkem - Bloky - Dny - Přípravky - Regrese - (Dny x x Nerovnoběžnost) = 3 844,06.

Validita zkoušky

Analýza potvrzuje, že data splňují podmínky nutné pro použití zkoušky:

1. významnost regrese: testovací statistika pro regresi (64,5) vypočtená s použitím rozptylu tvořeného rozdíly mezi králíky je větší než kritická hodnota interpolovaná z tabulky 3.2.4-I pro $P = 0{,}01$ s $f_1 = 1$ a $f_2 = 28$;
2. odchylka od rovnoběžnosti regresních přímek: test rovnoběžnosti v křížovém pokusu není příliš citlivý. Je totiž založen na reziduální chybě mezi králíky a ta závisí na variabilitě mezi nimi. Testovací statistika (1,06) je menší než kritická hodnota interpolovaná z tabulky 3.2.4-I pro $P = 0{,}05$ s $f_1 = 1$ a $f_2 = 28$;
3. žádná z interakcí není statisticky významná, jednotlivé hodnoty F jsou 0,02, 0,04 a 3,25.

Výpočet účinnosti a mezí spolehlivosti

Podíl sousedních dávek je 2,0, tedy $I = \ln 2 = 0{,}69315$. Podle tabulky 6.1 je $t = 2{,}05$ pro 28 stupňů volnosti ($P = 0{,}95$).

$$\bar{y}_U - \bar{y}_S = \frac{U - S}{2n} = \frac{-3}{32}$$

$$b = \frac{L_S + L_U}{2nI} = \frac{753}{32I} = -33{,}948$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}00276 = \text{logaritmus relativní účinnosti přípravku } \underline{U}$$

$$M = M' + \ln A_U = 0{,}00276 + \ln 40 = 3{,}6916 \ .$$

Odhad účinnosti se získá odlogaritmováním M. Účinnost je tedy 40,1 jednotek na mililitr.

$$C = \frac{E}{E - s^2t^2} = \frac{8859{,}5}{8859{,}5 - 137{,}3t^2} = 1{,}0697$$

$$H = \frac{E}{b^2dn} = \frac{8\,859{,}5}{(-33{,}948)^2 \ . \ 2 \ . \ 16} = 0{,}24023$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = 0{,}0697(0{,}0000081 + 0{,}48045) = 0{,}033488$$

Pro logaritmy mezí spolehlivosti se dostane:

$$\ln A_U + CM' \pm \sqrt{0{,}033498} = 3{,}6918 \pm 0{,}1830 \ .$$

Meze spolehlivosti jsou tedy 33,4 až 48,2 jednotek na mililitr.

3.3 Model poměru sklonů

Tento model je vhodný například pro mikrobiologické zkoušky, v nichž je nezávisle proměnnou koncentrace.

3.3.1 Podmínky validity

Stejně jako ve zkouškách založených na modelu rovnoběžnosti by se mělo testovat splnění podmínek 1, 2 a 3 kapitoly 3.1. Po přezkoušení platnosti podmínek 4B a 5B kapitoly 3.1 se může provést analýza rozptylu popsaná dále v kapitole 3.3.3.

Použití dále uvedených jednoduchých metod statistické analýzy vyžaduje splnění následujících podmínek:

1. standard i testovaný přípravek musí být testován pomocí dvou různých ředění;
2. musí existovat pátá skupina pokusných jednotek, které jsou bez ošetření.

3.3.2 Plán pokusu

Analýza modelu poměru sklonů se dá provést (2 + 2)dávkovou nebo (3 + 3)dávkovou zkouškou. Při celkově stejném počtu pokusných jednotek se však dá zmenšit rozptyl poměru účinností vytvořením skupiny bez ošetření (blank). Je tedy např. plán pětidávkových skupin se společnou skupinou bez ošetření vhodnější než (2 + 2)dávkový plán. Má minimální počet skupin uvažující ověření linearity závislosti na dávce pro oba přípravky. Přesnost odhadu účinnosti závisí na rozdělení pokusných jednotek do dávkových skupin a na volbě dávek. Přesnost odhadu účinnosti je možno zvýšit určitým nerovnoměrným rozdělením pokusných jednotek do skupin, což však snižuje přesnost indikace odchylky od linearity. Splnění následujících tří podmínek, kladených na plán pěti skupin se společnou skupinou bez ošetření, zajišťuje uspokojivou přesnost odhadu a vyhovující schopnost odhalení nelinearity:

1. všech pět skupin ošetření má stejný rozsah;
2. dávka standardu s_2 je co možná nejvyšší dávkou, jejíž průměrná odpověď leží ještě v lineární části regresní křivky, nízká s_1 je rovna její polovině;
3. dávky testovaného přípravku u_1 a u_2 jsou odvozeny z jeho deklarované účinnosti R.

Podobně jako v kapitole 3.2.2 se může použít plně či po blocích náhodný plán pokusu nebo latinský čtverec. Použití kteréhokoliv z těchto plánů vyžaduje podobnou úpravu postupu pro odhad reziduálního součtu čtverců jako u modelu rovnoběžnosti. K ní se dá využít tabulka 3.2.3-V.

Dále je popsána analýza zkoušky jednoho neznámého přípravku v porovnání se standardem. Analýzu se dvěma nebo více neznámými přípravky popsali Clarke[11] a Barraclough[12].

---

[11] Clarke, P. M.: Biometrics, 8, 1952, 370-379.
[12] Barraclough, C. G.: Biometrics, 11, 1955, 186-200.

3.3.3 Analýza rozptylu

Tato zkouška se obvykle analyzuje pomocí modelu vícenásobné regrese:

$$\boldsymbol{y = a + b_S v_S + b_U v_U}\ , \qquad (3.3.3\text{-}1)$$

kde y je odpověď a v_S, v_U jsou dávky standardu a testovaného přípravku.

Každou skupinu ošetření určují hodnoty v_S a v_U. Pro skupiny, které neobdržely dávku standardu, je $v_S = 0$. Stejně pro testovaný přípravek. Ruční zpracování se zjednoduší kódováním nižší a vyšší dávky standardu i přípravku hodnotami 0,45, resp. 1,0. Použije-li se toto značení (jako v tabulce 3.3.3-I), musí se nakonec provést korekce vypočtené účinnosti a regresních koeficientů. Vzorce pro výpočet jsou v tabulce 3.3.3-I. Po zkontrolování odpovědí a případné transformaci odpovědi se vypočtou jejich součty. Je třeba podotknout, že sklony regresní přímky jak pro standard, tak i pro zkoušený přípravek se počítají odděleně. Takže nejsou nezávislé, protože obě zčásti závisí na odpovědích ve skupině bez ošetření. Kontrast průsečíků (L_I) měří rozdíl odhadů odpovědí při nulové koncentraci, počítaných zvlášť pro standard i neznámý přípravek. Tímto kontrastem se testuje základní předpoklad modelu, tj. stejná odpověď při nulové dávce přípravků.

Kontrast nulové dávky (L_B) měří odchylku průměrné odpovědi na nulovou dávku od odpovědi na nulovou dávku, vypočítané pouze z odpovědí na nenulové dávky obou přípravků.

Tyto vzorce se použijí k porovnání zdrojů variability pomocí součtů čtverců popsaných v tabulce 3.3.3-II. Podobně jako dříve se vypočte korekční člen K, čtverec celkového součtu dělený počtem odpovědí a Σy^2 součet čtverců všech odpovědí.

Tab. 3.3.3-I Vzorce pro pětibodovou zkoušku se společnou skupinou bez ošetření

Součet odpovědí na nulovou dávku	B
Součet odpovědí na nižší dávku standardu	S_1
Součet odpovědí na vyšší dávku standardu	S_2
Součet odpovědí na nižší dávku testovaného přípravku	U_1
Součet odpovědí na vyšší dávku testovaného přípravku	U_2
Součet součinů pro standard	$0,5S_1 + S_2 - \frac{3(B + S_1 + S_2 + U_1 + U_2)}{10} = J_S$
Součet součinů pro testovaný přípravek	$0,5U_1 + U_2 - \frac{3(B + S_1 + S_2 + U_1 + U_2)}{10} = J_U$
Sklon regresní přímky standardu	$\frac{-15B + S_1 + 17S_2 - 6U_1 + 3U_2}{35\frac{n}{2}} = b_S$
Sklon regresní přímky testovaného přípravku	$\frac{-15B - 6S_1 + 3S_2 + U_1 + 17U_2}{35\frac{n}{2}} = b_U$
Kontrast nulové dávky	$2B - 2S_1 + S_2 - 2U_1 + U_2 = L_B$ [1)]
Kontrast průsečíků	$2S_1 - S_2 - 2U_1 + U_2 = L_I$ [1)]

[1)] L_B a L_I se nesmí zaměňovat s L_S...L_Z.

→ *Tento vývojový diagram ilustruje jednotlivé kroky analýzy výsledků zkoušky. Při použití tohoto grafu k vytvoření počítačového programu se při konečném rozhodnutí o přijetí, zamítnutí nebo modifikaci testu přihlíží k podrobnějším výsledkům, které poskytl počítač.*

Tab. 3.3.3-II Validita zkoušky

Zdroj variability	Stupně volnosti	Součet čtverců
regrese	2	$b_S J_S + b_U J_U$
nulová dávka	1	$\frac{L_B^2}{14n}$
průsečík	1	$\frac{L_I^2}{10n}$
reziduální chyba	$5n$ - 5	*
celkem	$5n$ - 1	$\Sigma y^2 - K$

* Vypočte se odečtením všech součtů čtverců od celkového součtu čtverců.

3.3.4 Test validity

Testovací statistiky pro test závislosti na dávce, kontrastu nulové dávky a kontrastu průsečíku se vypočtou dělením příslušných součtů čtverců jejich stupni volnosti a reziduálním rozptylem s_r^2, který se získá dělením reziduálního součtu čtverců jeho stupni volnosti. Významnost těchto podílů (F-statistik) se zjistí porovnáním s kritickými hodnotami v tabulce 3.2.4-I.

Podmínky validity:

1. kontrast průsečíků nesmí být statisticky významný;
2. variabilita způsobená dávkou musí být vysoce statisticky významná (hladina významnosti musí být menší než 0,01);
3. kontrast nulové dávky nesmí být statisticky významný. Významnost tohoto kontrastu může být způsobena nelinearitou vztahu dávky a odpovědi pro velmi malé dávky. Pokud k tomu dojde při zavádění metody v laboratoři, může se zkouška vylepšit přidáním malé konstantní dávky standardu ke všem dávkám. Pro další analýzu se pak berou za dávky pouze dávky standardu a testovaného přípravku nad tímto konstantním pozadím. Dojde-li k tomu během rutinního hodnocení, měl by se analytik poradit se statistikem, jak analyzovat zkoušku po vyloučení nulové dávky.

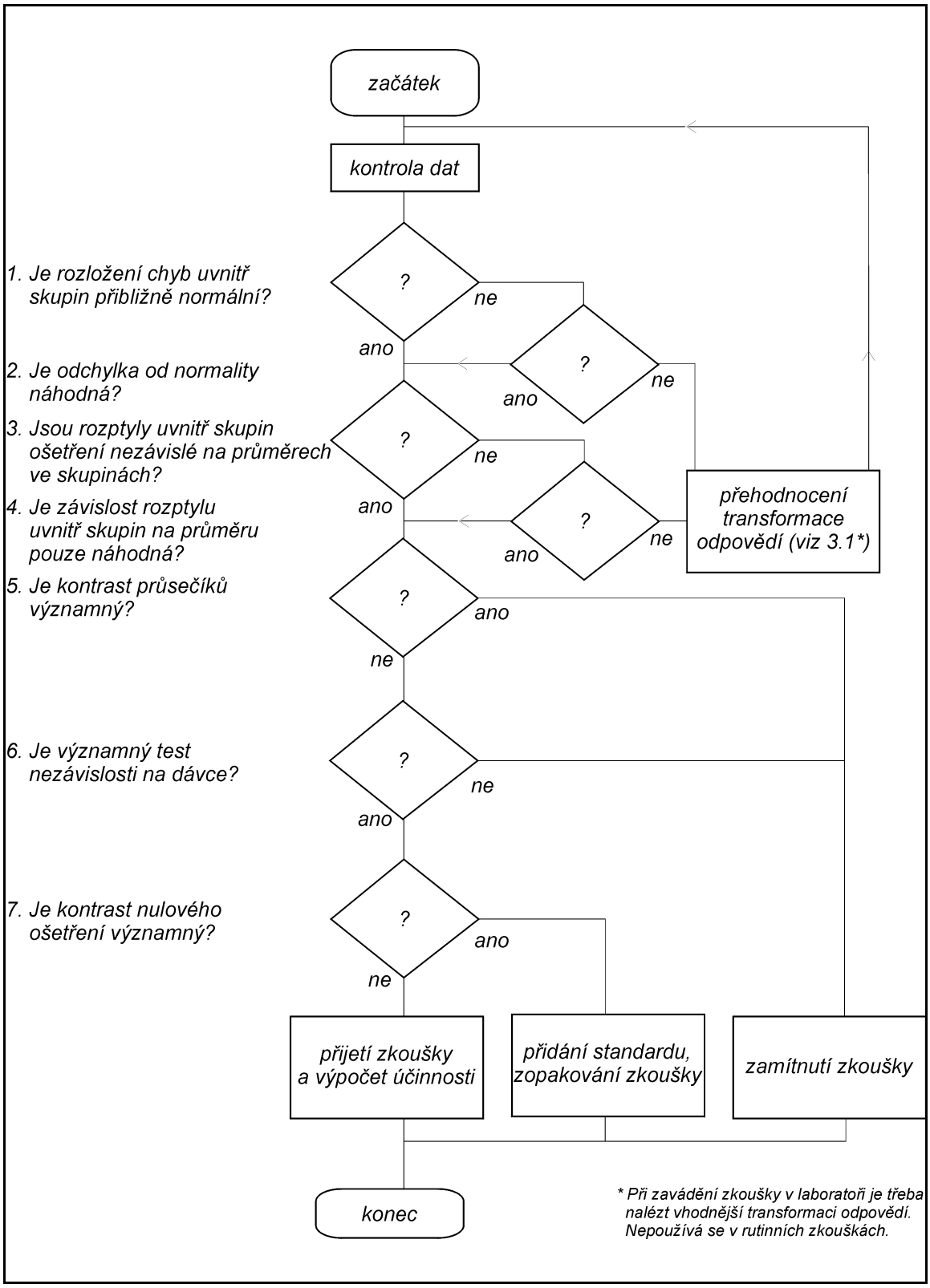
Prokáží-li příslušné testy validitu zkoušky, může být vypočtena účinnost a její meze spolehlivosti postupem popsaným v kapitole 3.3.5.

3.3.5 Odhad účinnosti a její meze spolehlivosti

Účinnost neznámého přípravku vyjádřená ve vyšší dávce standardu jako jednotce je:

$$R = \frac{b_U}{b_S} . \qquad (3.3.5\text{-}1)$$

Meze spolehlivosti jsou:



Obr. 3.3.4-I Vývojový diagram testů validity v rutinní zkoušce: model podílu sklonů

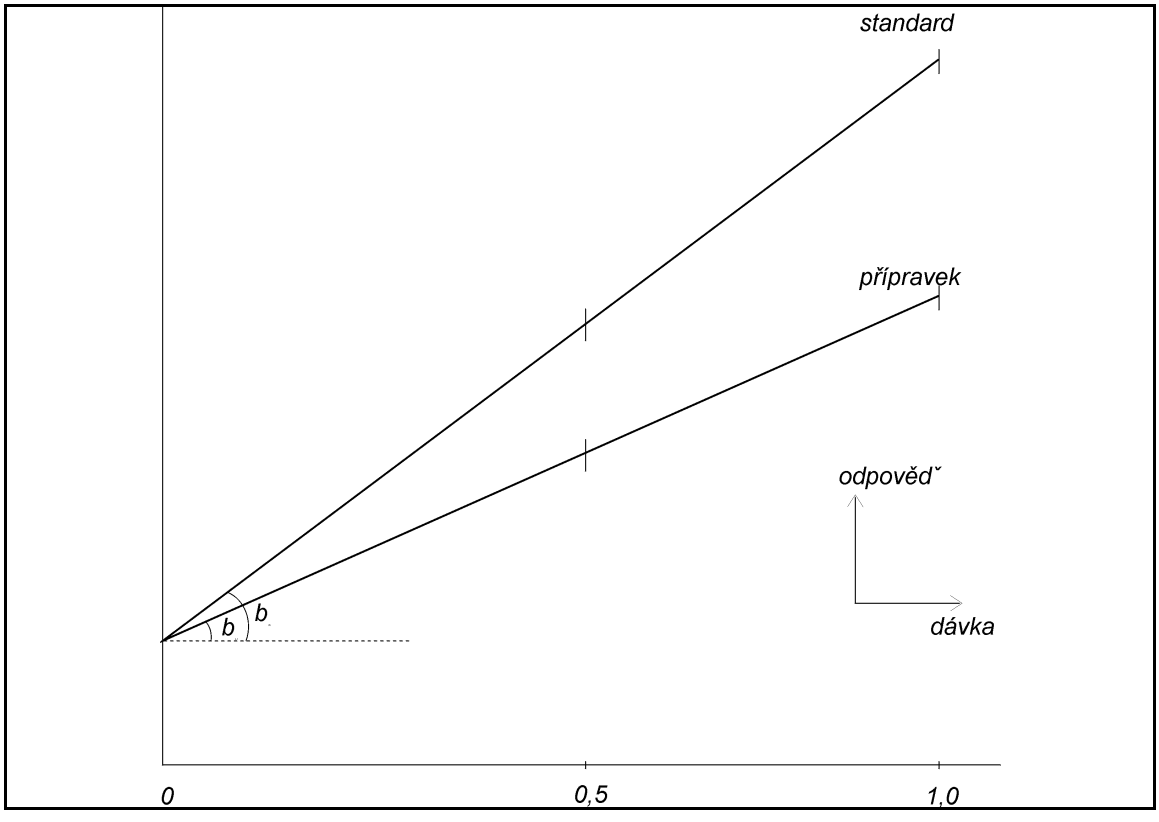
$$C\left[R - \frac{36t^2s^2}{35nb_S^2} \pm \frac{t}{b_S}\sqrt{\frac{8s^2}{35n}\left(8 - 9R + 8R^2 - \frac{10t^2s^2}{nb_S^2}\right)}\right], \qquad (3.3.5\text{-}2)$$

kde:

$$C = \frac{35nb_S^2}{35nb_S^2 - 64t^2s^2}\ . \qquad (3.3.5\text{-}3)$$

Kritická hodnota t z tabulky 6.1 má stupně volnosti reziduálního rozptylu.

Účinnost zkoušeného přípravku se získá vynásobením relativní účinnosti a jejích mezí spolehlivosti vyšší dávkou standardu v obsahových jednotkách mezinárodního systému (viz obr. 3.3.5-I).



Obr. 3.3.5-I Model podílu sklonů, plán pěti skupin se společnou nulovou skupinou

Na základě deklarované účinnosti zkoušeného přípravku jsou jeho dávky u_1 a u_2 stanoveny tak, aby byly ekvivalentní dávkám standardu s_1 a s_2; dávky s_2 a u_2 jsou označeny hodnotou 1,0, dávky s_1 a u_1 hodnotou 0,5. Svislé úsečky vyjadřují rozpětí odpovědí v jednotlivých skupinách na dávky vyznačené na vodorovné ose. V tomto modelu mají regresní přímky závislosti odpovědi na dávce standardu a testovaného přípravku sklony b_S a b_U.

3.3.6 Chybějící hodnoty

Při náhradě chybějících dat se postupuje stejně jako v kapitole 3.2.6.

4 Kvantální zkoušky

4.1 Úvod

V některých zkouškách je nemožné nebo extrémně náročné měřit působení přípravku na každé pokusné jednotce. Místo toho je pozorován nějaký efekt působení přípravku na pokusné jednotky, jako například uhynutí nebo hypoglykemický symptom pokusných jednotek. Výsledek pak závisí na počtu jednotek, u kterých se projeví tento efekt. Takové zkoušky se nazývají kvantální "vše nebo nic".

Situace je velmi podobná kvantitativní zkoušce popsané v kapitole 3.1, ale místo n různých odpovědí v každé ošetřené skupině se získá pouze jediná hodnota, tj. procento jednotek s pozitivní odpovědí. Grafem závislosti tohoto procenta na logaritmu dávky je zpravidla spíše křivka tvaru S než přímka. Uspokojivějšího lineárního vztahu se dá dosáhnout transformací procenta pomocí vhodné matematické funkce. Nejpoužívanější je probitová transformace, další používané jsou arcsin a log-log transformace.

4.2 Probitová metoda

Podrobná statistická analýza lineární regresní závislosti transformované odpovědi na logaritmu dávky je velmi pracná. Dá se provést iteračně metodou maximální věrohodnosti. K dispozici jsou však počítačové programy. Tato analýza je popsána v mnohých učebnicích.

Za předpokladu, že je dostatečný počet odpovědí různých od nulových a stoprocentních, a za předpokladu, že není významná odchylka od linearity, dávají dostatečně přesné výsledky často již i prvé dva kroky probitové metody. Následující metoda se týká porovnání jednoho přípravku se standardem. Při porovnání více přípravků se standardem je nutná porada s biometrem. Výpočet se dá provést pomocí tabulek a kalkulačky. Kroky 1 až 5 poskytují první aproximaci, kroky 6 až 9 druhou. Kroky 10 až 11 obsahují test linearity a rovnoběžnosti závislosti probitu na logaritmu dávky pro standard a testovaný přípravek a v kroku 12 je počítán logaritmus účinnosti M' a jeho meze spolehlivosti.

Stejná posloupnost kroků se dá použít k vytvoření počítačového programu s využitím modifikací popsaných na konci každého z následujících kroků.

Probit je jednoduchá lineární funkce standardní normální veličiny T. Počítačový program se dá sestavit s využitím následujících proměnných:

1. standardizovaná normální veličina T;
2. hustota D odpovídající hodnotě standardizované normální veličiny T, pro $T = T_i$ je $D = D_i$;
3. pravděpodobnost P, že veličina T má hodnotu nejvýše T_i ($T \leq T_i$).

První algoritmus odhaduje T z hodnot P a druhý umožňuje získat odhady D a P odpovídající hodnotě T. Veličiny T, D a P se odhadují pro každou dávkovou skupinu i (T_i, D_i a P_i).

Postup

1. Sestavení tabulek výsledků

Použije se tabulka 4.2-I pro zapsání každé skupiny ošetření do sloupců označených čísly:

1. přípravek (standardní nebo testovaný),
2. X je logaritmus dávky (nebo jeho jednoduchý kód),
3. počet testovaných jedinců n při této dávce,
4. počet reagujících jedinců r při této dávce.

Počítačový program může obsahovat převod dávek na jejich logaritmus X.

2. Výpočet podílu (procenta) reagujících v dávkové skupině

Výpočet empirického podílu $p = r/n$ a jeho zapsání do sloupce 5. Obvykle stačí dvě desetinná místa. Ošetřené skupiny s $p = 0$ a $p = 1$ se vyloučí.

3. Empirické probity

Z tabulky 4.2-II se získají pro každou skupinu ošetření empirické probity Y_e odpovídající empirickému podílu p (vyjádřenému v procentech) a zapíší se do sloupce 6.

Pro výpočet empirických probitů se může použít algoritmus 4.2-I k vyjádření odpovědi tvaru $Y_e = T + 5$ (tím se odstraní záporné odpovědi).

4. Nevážená lineární regrese odpovědi na logaritmu dávky

Počáteční odhad tohoto vztahu se může získat buď graficky (viz obr. 4.3-I), nebo početně. Při použití první metody se nejprve sestrojí bodový graf hodnot Y_e v závislosti na X a získanými body se zvlášť pro standardní a testovaný přípravek "od oka" proloží rovnoběžné přímky s větším důrazem na body s empirickými probity mezi 4,0 a 6,0 než na body mimo tyto meze.

Druhý způsob spočívá v proložení přímek metodou nevážené lineární regrese. Vypočtou se:

$$b = \frac{\Sigma\Sigma(X - \bar{X})(Y_e - \bar{Y}_e)}{\Sigma\Sigma(X - \bar{X})^2}, \qquad (4.2\text{-}1)$$

(dvojitě jsou označeny součty pro všechny skupiny ošetřené standardním nebo zkoušeným přípravkem dohromady),

$$a = \bar{Y}_e - b\bar{X}. \qquad (4.2\text{-}2)$$

(Parametr se vypočte zvlášť pro standardní a zkoušený přípravek.)

Počítačový program používá k získání regresních parametrů a a b rovněž tyto vzorce.

5. První aproximace očekávaných probitů

Při použití grafické metody se na přímkách pro obě ošetření na grafu odečtou hodnoty Y a zapíší se do sloupce 7.

Při použití početní metody poskytuje počáteční aproximaci Y_I ke každé hodnotě X zvlášť pro standardní a testovaný přípravek rovnice:

$$Y_I = a + bX. \qquad (4.2\text{-}3)$$

Stejná rovnice se užívá i v počítačovém programu.

6. Váhové koeficienty

Pro každé Y_I se v tabulce 4.2.-III najde hodnota váhového koeficientu w a zapíše se do sloupce (8), součin nw pak do sloupce (9). Všechny hodnoty nw se udávají na stejný počet desetinných míst. Obvykle stačí jedno desetinné místo.

V počítačovém programu se k výpočtu váhových koeficientů použije algoritmus 4.2-II (viz dále): k vstupním hodnotám T_i, které odpovídají hodnotám Y_i, se vypočtou hodnoty P_i a D_i. Z nich se vypočtou váhy w_i pro každou hodnotu Y_i podle vzorce:

$$w_i = \frac{D_i^2}{P_i(1 - P_i)}. \qquad (4.2\text{-}4)$$

7. Pracovní probity

Pomocí tabulky 4.2.-III a následujících vzorců se vypočtou pracovní probity y_i pro všechny skupiny i:

$$y_i = Y_0 + PA \text{ pro } Y_I < 3{,}5 \,, \tag{4.2-5}$$

$$y_i = Y_1 - (1 - P)A \text{ pro } Y_I > 6{,}5 \,, \tag{4.2-6}$$

$$y_i = (1 - P)Y_0 + PY_1 \text{ pro } 3{,}5 < Y_I < 6{,}5 \,. \tag{4.2-7}$$

Y_0, Y_1 a A značí minimální probit, maximální probit a rozsah, P je pravděpodobnost příslušná k první aproximaci empirického probitu Y_I. Pracovní probit y_i se zapíše do sloupce (10) v tabulce 4.2-I. Obvykle stačí dvě desetinná místa. Jejich počet by měl být stejný pro všechny ošetřené skupiny.

Pro počítačový program jsou vhodné následující dva vzorce pro pracovní probity y_i odpovídající hodnotám Y_I:

$$\text{pro } Y_I \le 5{,}0 \quad y_i = Y_I - \frac{P_i}{D_i} + \frac{p_i}{D_i} \,, \tag{4.2-8}$$

$$\text{pro } Y_I > 5{,}0 \quad y_i = Y_I + \frac{1 - P_i}{D_i} - \frac{1 - p_i}{D_i} \,. \tag{4.2-9}$$

Hodnota D_i odpovídá empirickému podílu p_i (jakožto pravděpodobnosti).

8. Vážené průměry, součty čtverců a součty součinů

Pro všechna ošetření se vytvoří součiny nwy, nwX a $nwXy$ a zapíší se do sloupců (11), (12) a (13). Zvlášť pro standard a přípravek se vypočtou součty sloupců (9), (11) a (12) a z nich vážené průměry:

$$\bar{X} = \frac{\Sigma nwX}{\Sigma nw} \,, \tag{4.2-10}$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma nwy}{\Sigma nw} \,. \tag{4.2-11}$$

Dále se vypočtou součiny nwX^2, nwy^2 a $nwXy$, z nich vážené součty čtverců $\bar{X}$ a $\bar{y}$ a součty součinů Xy, opět zvlášť pro standard a testovaný přípravek. S jejich pomocí se vypočtou veličiny S_{XX}, S_{Xy} a S_{yy} podle těchto vzorců:

$$S_{XX} = \Sigma nw(X - \bar{X})^2 = \Sigma nwX^2 - \frac{(\Sigma nwX)^2}{\Sigma nw} \,, \tag{4.2-12}$$

$$S_{Xy} = \Sigma nw(X - \bar{X})(y - \bar{y}) = \Sigma nwXy - \frac{(\Sigma nwX)(\Sigma nwy)}{\Sigma nw} \,, \tag{4.2-13}$$

$$S_{yy} = \Sigma nw(y - \bar{y})^2 = \Sigma nwy^2 - \frac{(\Sigma nwy)^2}{\Sigma mw} \,. \tag{4.2-14}$$

Stejné vzorce se použijí i v počítačovém programu.

9. Druhá a další aproximace probitů

Pro druhou (lineární) aproximaci probitů se nejprve vypočte společný parametr sklonu b_2 podle vzorce:

$$b_2 = \frac{\Sigma S_{Xy}}{\Sigma S_{XX}} . \qquad (4.2\text{-}15)$$

(Sčítají se hodnoty pro standardní a zkoušený přípravek.)

Tato hodnota se použije k výpočtu parametru a_2 zvlášť pro každý z přípravků:

$$a_2 = \bar{y} - b_2\bar{X} . \qquad (4.2\text{-}16)$$

Tak se získá druhá aproximace Y_{II} pro standard a přípravek odděleně ve tvaru dvou regresních přímek:

$$Y_{II} = a_2 + b_2X . \qquad (4.2\text{-}17)$$

Podle těchto rovnic se vypočtou hodnoty Y_{II} pro všechny skupiny ošetřované oběma přípravky a porovnají se s odpovídajícími hodnotami Y_I. Jsou-li alespoň některé rozdíly mezi nimi velké, např. větší než 0,1 při počítání na jedno desetinné místo, vypočte se další aproximace zopakováním kroků 6 až 9, přičemž se všechny hodnoty Y_I nahradí příslušnými hodnotami Y_{II}. Stejně se postupuje i tehdy, jeví-li uvedené rozdíly závislost na dávce.

V počítačovém programu se vypočtou pro všechny ošetřené skupiny čtverce rozdílů Y_{II} - Y_I a jejich součet. Je-li tento součet čtverců větší než například 10^{-7}, nahradí se všechny hodnoty Y_I příslušnými hodnotami Y_{II} a opakují se kroky 6 až 9.

10. Test odchylky od linearity

Ve zkoušce alespoň se třemi dávkami pro každý přípravek se dá testovat významnost odchylky od linearity pomocí statistiky:

$$\chi^2 = \Sigma S_{yy} - \Sigma\frac{S_{Xy}^2}{S_{XX}} , \qquad (4.2\text{-}18)$$

s $f = (k - 4)$ stupni volnosti. Odpovídající kritické hodnoty jsou v tabulce 6.2. Při významné hodnotě χ^2 je nutno konzultovat vyhodnocení zkoušky se statistikem. Počítačový program může poskytnout obsluze vypočtený χ^2 a příslušné stupně volnosti bez dalšího komentáře. Jiná možnost je vytvořit soubor kritických hodnot z podprogramu, který vypočte aproximaci pravděpodobnosti překročení hodnoty χ^2. Vhodné vzorce k těmto výpočtům jsou v knize Abramowitz a Stegun[13)].

11. Test odchylky od rovnoběžnosti

Pokud se neprokázala významná odchylka od linearity, pak se testuje ještě rovnoběžnost pomocí statistiky:

$$\chi^2 = \Sigma\frac{S_{Xy}^2}{S_{XX}} - \frac{(\Sigma S_{Xy})^2}{\Sigma S_{XX}} \qquad (4.2\text{-}19)$$

s jedním stupněm volnosti.

12. Výpočet účinnosti a jejích mezí spolehlivosti

Při nevýznamné odchylce od rovnoběžnosti je možno počítat logaritmus účinnosti M' podle vzorce:

[13)] Abramowitz, M., Stegun, I. A.: Handbook of Mathematical Functions. 9th Ed. New York, Dover Publications Inc. 1970.

$$M' = \frac{y_U - y_S}{b} + (X_S - X_U) \ . \qquad (4.2\text{-}20)$$

Účinnost je pak antilogaritmus M' (exp(M')). Meze spolehlivosti se vypočtou jako antilogaritmy hodnot:

$$(X_S - X_U) + C(M' - X_S + X_U) \pm \frac{t\sqrt{C}}{b}\sqrt{\frac{1}{\Sigma_S nw} + \frac{1}{\Sigma_U nw} + \frac{(y_S - y_U)^2 C}{b^2 \Sigma S_{XX}}} \ , \qquad (4.2\text{-}21)$$

kde:

$$C = \frac{b^2 \Sigma S_{XX}}{b^2 \Sigma S_{XX} - t^2} \ . \qquad (4.2.\text{-}22)$$

Je patrná analogie těchto výrazů s výrazem 3.2.5-4 pro výpočet mezí spolehlivosti ve zkouškách účinnosti s kvantitativní odpovědí. Součet čtverců pro regresi v kapitole 3.2.3 se dá psát ve tvaru:

$$E = \frac{[\Sigma(X - X)(y - y)]^2}{\Sigma(X - X)^2} = b^2 \Sigma(X - X)^2 \ . \qquad (4.2\text{-}23)$$

Při probitové transformaci je reziduální rozptyl odpovědí roven jedné. Kritická hodnota t s ∞ stupni volnosti se najde v tabulce 6.1.

Pro nekonečný počet stupňů volnosti má veličina t standardní normální rozdělení, takže počítačový program může počítat požadovanou hodnotu t algoritmem 4.2-I s pravděpodobností P odpovídající polovině požadované hladiny významnosti.

Algoritmus 4.2-I

Algoritmus požaduje jako vstup pravděpodobnost P_i a počítá T_i aproximované pomocí:

$$T_i = \frac{\sum_{j=0}^{j=2} a_j w^j}{\sum_{j=0}^{j=3} b_j w^j} - w \ ,$$

kde:

$$w = \sqrt{\ln\left(\frac{1}{P^2}\right)} \text{ pro } 0 < P(T_i \le T) \le 0{,}5 \ .$$

$a_0 = 2{,}515517$	$b_0 = 1{,}0$
$a_1 = 0{,}802853$	$b_1 = 1{,}432788$
$a_2 = 0{,}010328$	$b_2 = 0{,}189269$
	$b_3 = 0{,}001308$

Je-li $P > 0{,}5$, dosadí se ve vzorci pro w za P hodnota (1 - P) a výsledné T_i se vynásobí -1.

Tento a následující algoritmus jsou převzaty z příručky Abramowitze a Steguna [14].

Algoritmus 4.2-II

Algoritmus požaduje T_i jako vstup a počítá hustotu D a aproximaci P pomocí následujících formulí:

$$D = \frac{e^{-\left(\frac{1}{2}T_i^2\right)}}{\sqrt{2\pi}}$$

$$P(T \leq T_i) = 1 - D\sum_{j=1}^{j=5} a_j w^j \text{ pro } T_i \geq 0 ,$$

kde:

$$w = \frac{1}{1 + 0{,}2316419T_i} .$$

$a_1 = 0{,}3193815$
$a_2 = -0{,}3565638$
$a_3 = 1{,}781478$
$a_4 = -1{,}821256$
$a_5 = 1{,}330724$

Je-li $T_i < 0$, dosadí se ve vzorci pro w za T_i hodnota $-T_i$ a místo vypočtené hodnoty P_i se vezme $1 - P_i$.

Tab. 4.2-I Výsledné veličiny

Přípravek	X	n	r	p	Y_e	Y_I	w	nw	y	nwy	nwX	$nwXy$	Y_{II}
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)

Tab. 4.2-II Probity odpovídající procentům P

P	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

[14] Abramowitz, M., Stegun, I. A.: Handbook of Mathematical Functions. 9th Ed. New York, Dover Publications Inc. 1970.

Tab. 4.2-III Minimální a maximální pracovní probity, rozsah a váhové koeficienty

Empirický probit	Minimální pracovní probit	Rozsah	Maximální pracovní probit	Empirický probit	Váhy
Y_e	Y_0	A	Y_1	Y_e	w
1,1	0,8579	5034,0	9,1421	8,9	0,00082
1,2	0,9522	3425,0	9,0478	8,8	0,00118
1,3	1,0462	2354,0	8,9538	8,7	0,00167
1,4	1,1400	1634,0	8,8600	8,6	0,00235
1,5	1,2334	1146,0	8,7666	8,5	0,00327
1,6	1,3266	811,5	8,6734	8,4	0,00451
1,7	1,4194	580,5	8,5806	8,3	0,00614
1,8	1,5118	419,4	8,4882	8,2	0,00828
1,9	1,6038	306,1	8,3962	8,1	0,01104
2,0	1,6954	225,6	8,3046	8,0	0,01457
2,1	1,7866	168,00	8,2134	7,9	0,01903
2,2	1,8771	126,34	8,1228	7,8	0,02458
2,3	1,9673	95,96	8,0327	7,7	0,03143
2,4	2,0568	73,62	7,9432	7,6	0,03977
2,5	2,1457	57,05	7,8543	7,5	0,04979
2,6	2,2339	44,654	7,7661	7,4	0,06168
2,7	2,3214	35,302	7,6786	7,3	0,07564
2,8	2,4081	28,189	7,5919	7,2	0,09179
2,9	2,4938	22,736	7,5062	7,1	0,11026
3,0	2,5786	18,522	7,4214	7,0	0,13112
3,1	2,6624	15,2402	7,3376	6,9	0,15436
3,2	2,7449	12,6662	7,2551	6,8	0,17994
3,3	2,8261	10,6327	7,17316	6,7	0,20774
3,4	2,9060	9,0154	7,0940	6,6	0,23753
3,5	2,9842	7,7210	7,0158	6,5	0,26907
3,6	3,0606	6,6788	6,9394	6,4	0,30199
3,7	3,1351	5,8354	6,8649	6,3	0,33589
3,8	3,2074	5,1497	6,7926	6,2	0,37031
3,9	3,2773	4,5903	6,7227	6,1	0,40474
4,0	3,3443	4,1327	6,6557	6,0	0,43863
4,1	3,4083	3,7582	6,5917	5,9	0,47144
4,2	3,4687	3,4519	6,5313	5,8	0,50160
4,3	3,5251	3,2025	6,4749	5,7	0,53159
4,4	3,5770	3,0010	6,4230	5,6	0,55788
4,5	3,6236	2,8404	6,3764	5,5	0,58099
4,6	3,6643	2,7154	6,3357	5,4	0,60052
4,7	3,6982	2,6220	6,3018	5,3	0,61609
4,8	3,7241	2,5573	6,2759	5,2	0,62742
4,9	3,7407	2,5192	6,2593	5,1	0,63431
5,0	3,7467	2,5066	6,2533	5,0	0,63662
5,1	3,7401	2,5192	6,2599	4,9	0,63431
5,2	3,7186	2,5573	6,2814	4,8	0,62742
5,3	3,6798	2,6220	6,3202	4,7	0,61609
5,4	3,6203	2,7154	6,3797	4,6	0,60052

Empirický probit	Minimální pracovní probit	Rozsah	Maximální pracovní probit	Empirický probit	Váhy
Y_e	Y_0	A	Y_1	Y_e	w
5,5	3,5360	2,8404	6,4640	4,5	0,58099
5,6	3,4220	3,0010	6,5780	4,4	0,55788
5,7	3,2724	3,2025	6,7276	4,3	0,53159
5,8	3,0794	3,4519	6,9206	4,2	0,50260
5,9	2,8335	3,7582	7,1665	4,1	0,47144
6,0	2,5230	4,1327	7,4770	4,0	0,43863
6,1	2,1324	4,5903	7,8676	3,9	0,40474
6,2	1,6429	5,1497	8,3571	3,8	0,37031
6,3	1,0295	5,8354	8,9705	3,7	0,33589
6,4	0,2606	6,6788	9,7394	3,6	0,30199
6,5	-0,7052	7,7210	10,7052	3,5	0,26907

4.3 Příklad

Zkouška insulinu na myších podkožním podáním

Standardní přípravek byl podáván v dávkách 0,024 a 0,04 jednotek na myš v dávce o objemu 0,25ml. Odpovídající dávka přípravku $\underline{U}$ byla připravena na základě deklarované účinnosti $A_U = 40$ jednotek na ml. Každá dávka byla podána dvaceti čtyřem jedincům.

Kladná odpověď byla definována jako hypoglykemická křeč v průběhu 75 minut po podkožním podání insulinu.

V tabulce 4.3-I je počet (r) jedinců každé skupiny reagujících kladně, společně s podílem odpovědí p a odpovídajícím probitem z tabulky 4.2-II.

Tab. 4.3-I Odpovědi a empirické probity

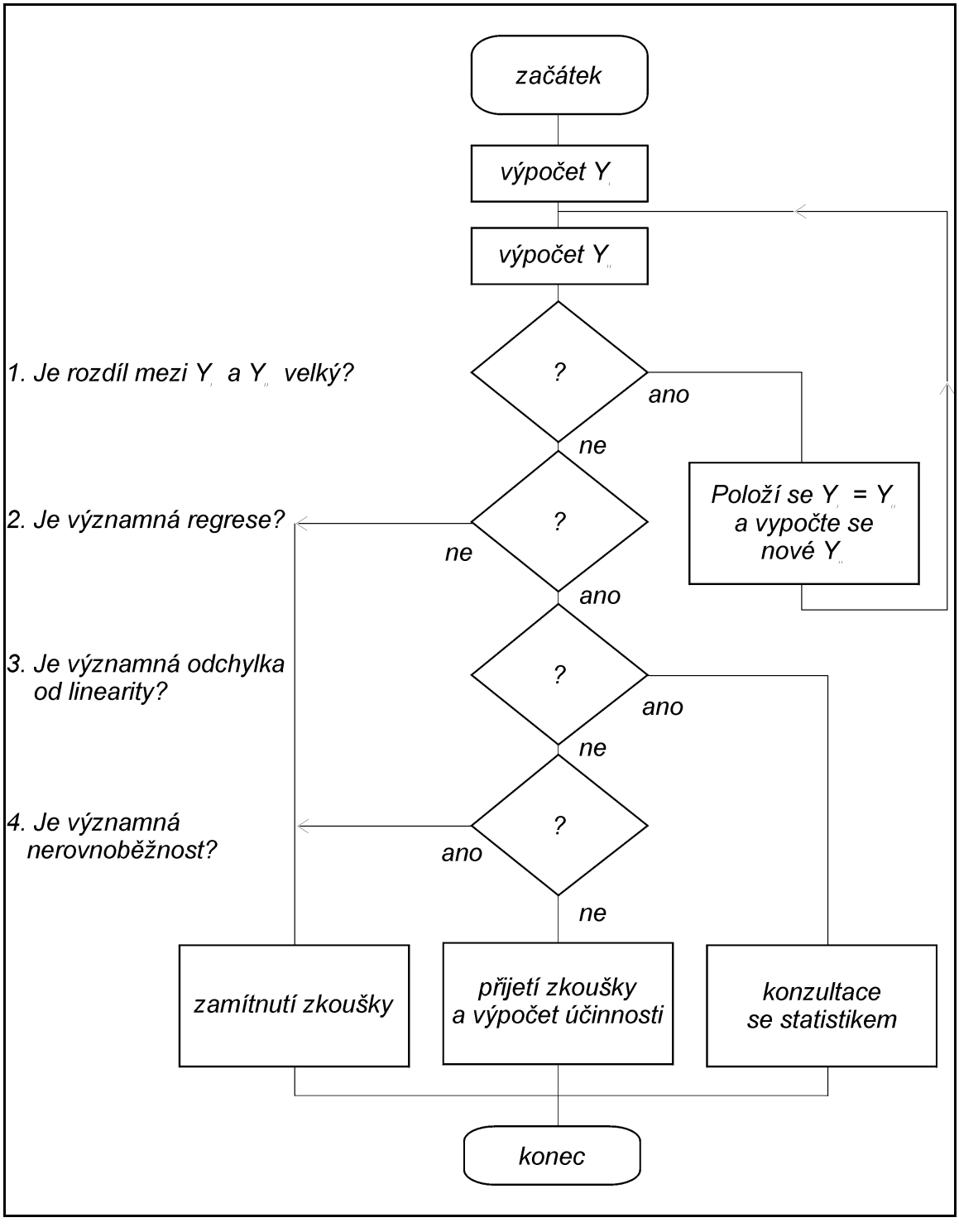
Přípravek	Dávka	ln (dávky) = x	n	r	$p = r/n$	empirický probit, y
standard $\underline{S}$	s_2	3,689	24	21	0,88	6,18
	s_1	3,178	24	8	0,33	4,56
přípravek	u_1	3,689	24	20	0,83	5,95
$\underline{U}$	u_2	3,178	24	10	0,42	4,80
celkem		13,734				21,49

První aproximace probitů

První aproximace může být získána jedním z dvou následujících způsobů:

1. graficky, nakreslením probitů z tabulky 4.3.-I proti ln (dávky) do bodového grafu a proložením "podle oka" dvou rovnoběžných přímek (kapitola 4.2, krok 4-5) pro standard a zkoušený přípravek a odečtením hodnot aproximovaných probitů na těchto přímkách;
2. výpočtem těchto přímek metodou nevážené lineární regrese.

V příkladu se postupuje druhou metodou, jejíž použití je pro počítače vhodnější a navíc poskytuje při opakovaném výpočtu stejné výsledky. V použitém příkladu je obtížné odhadnout rovnoběžné přímky od oka, protože spojnice bodů pro standard a bodů pro zkoušený přípravek se protínají.



Algoritmus 4.2-III Vývojový diagram testů validity v rutinní kvantální zkoušce

Vývojový diagram zobrazuje logické kroky při hodnocení výsledků kvantální zkoušky.

Je-li na základě tohoto diagramu vytvořen program, musí výsledné rozhodnutí (přijmout, zamítnout nebo modifikovat zkoušku) provést experimentátor na základě detailních výsledků poskytnutých počítačem.

Společný sklon rovnoběžných regresních přímek se vypočte podle vzorce:

$$b = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{k}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{k}} ,$$

kde k je počet všech ošetřených skupin, sčítá se přes všechny skupiny,
x = ln (dávky)
y = empirický probit (tabulka 4.3-I)

$$\Sigma x^2 = 47{,}4168;\ \Sigma xy = 74{,}4937;\ b = 2{,}71124 .$$

Parametry a obou přímek udává rovnice:

$$a_i = \bar{y}_i - b\bar{x},\ \text{kde}\ \bar{x} = 3{,}4334,\ \bar{y}_S = 5{,}370\ \text{a}\ \bar{y}_U = 5{,}375 .$$

Rovnice regresních přímek jsou $Y = a + bx$ (viz obr. 4.3-I).
Přímka standardu je $Y = -3{,}936 + 2{,}711x$ a přímka přípravku $\underline{U}$ $Y = -3{,}931 + 2{,}711x$.
Očekávané probity Y_I se získají dosazením hodnot 3,689 a 3,178 za x do odpovídajících rovnic.
Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.3.-II společně s vahami w, minimálním pracovním probitem Y_0 a rozsahem A interpolovaným podle tabulky 4.2-III. Pracovní probity y se vypočtou podle rovnice:

$$y = Y_0 + pA .$$

Tab. 4.3-II Očekávané probity

Přípravek	x	p	Y_I	w	Y_0	A	y
standard $\underline{S}$	3,689 3,178	0,88 0,33	6,06 4,68	0,418 0,613	2,289 3,691	4,407 2,641	6,167 4,563
přípravek $\underline{U}$	3,689 3,178	0,83 0,42	6,07 4,68	0,415 0,613	2,250 3,691	4,453 2,641	5,946 4,800

Pro hodnocení standardního a testovaného přípravku se vypočtají následující statistiky:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma nwx}{\Sigma nw} \qquad \bar{y} = \frac{\Sigma nwy}{\Sigma nw} ,$$

$$S_{xx} = \Sigma nwx^2 - \frac{(\Sigma nwx)^2}{\Sigma nw} \qquad S_{xy} = \Sigma nwxy - \frac{(\Sigma nwx)(\Sigma nwy)}{\Sigma nw} .$$

Jejich hodnoty jsou v tabulce 4.3-III.

Tab. 4.3-III

Přípravek	Σnw	Σnwx	Σnwy	$\Sigma nwxy$	Σnwx^2	S_{xx}	Sxy	$\bar{x}$	$\bar{y}$
standard	24,744	83,763	128,998	441,571	285,109	1,5558	4,8890	3,3852	5,1133
přípravek $\underline{U}$	24,672	83,497	129,840	442,892	284,128	1,5506	3,4769	3,3843	5,2626
součet	49,416					3,1064	8,3659		

Druhá aproximace parametrů dvojice regresních přímek je:

$$b = \frac{\Sigma S_{xy}}{\Sigma S_{xx}} = 2{,}693 \ ,$$

$$a_S = \bar{y}_S - b\bar{x}_S = -3{,}903 \qquad a_U = \bar{y}_U - b\bar{x}_U = -3{,}851 \ .$$

Takže přímka standardu je $Y = -3{,}903 + 2{,}693x$
a přímka přípravku $\underline{U}$ je $Y = -3{,}851 + 2{,}693x$.

Očekávané probity odečtené z těchto přímek jsou tedy 6,03, 4,66, 6,08 a 4,71 pro dávky s_2, s_1, u_2 a u_1.

Maximální rozdíl mezi probity odpovídajících dávek z tabulky 4.3-II je 0,03. Shoda mezi dvěma po sobě následujícími aproximacemi probitů je dostatečná.

Validita zkoušky

Odchylka od rovnoběžnosti se testuje statistikou:

$$\Sigma\frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{(\Sigma S_{xy})^2}{\Sigma S_{xx}} = 15{,}3633 + 7{,}7962 - 22{,}5304 = 0{,}63 \ ,$$

Tento test nevyvrací předpoklad rovnoběžnosti, protože hodnota je menší než kritická hodnota 8,47 pro ^{2} z tabulky 6.2 pro 1 stupeň volnosti a $P = 0{,}95$.

Výpočet účinnosti a meze spolehlivosti

V tabulce 6.1 je $t = 1{,}96$ pro nekonečný počet stupňů volnosti a $P = 0{,}95$.

Logaritmus relativní účinnosti se vypočte z hodnot v tabulce 4.3-III a společného regresního koeficientu:

$$M' = \bar{x}_S - \bar{x}_U + \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}0009 + \frac{0{,}0493}{2{,}693} = 0{,}01921 \ ,$$

$$M = M' + \ln \mathrm{A} = 0{,}01921 + \ln 40 = 3{,}708 \ .$$

Odhad účinnosti je tedy exp(M) = 40,8 jednotek na mililitr:

$$C = \frac{b^2\Sigma S_{xx}}{b^2\Sigma S_{xx} - t^2} = \frac{2{,}693^2 \ . \ 3{,}1064}{2{,}693^2 \ . \ 3{,}1064 - 1{,}96^2} = \frac{22{,}5284}{18{,}6868} = 1{,}2056 \ ,$$

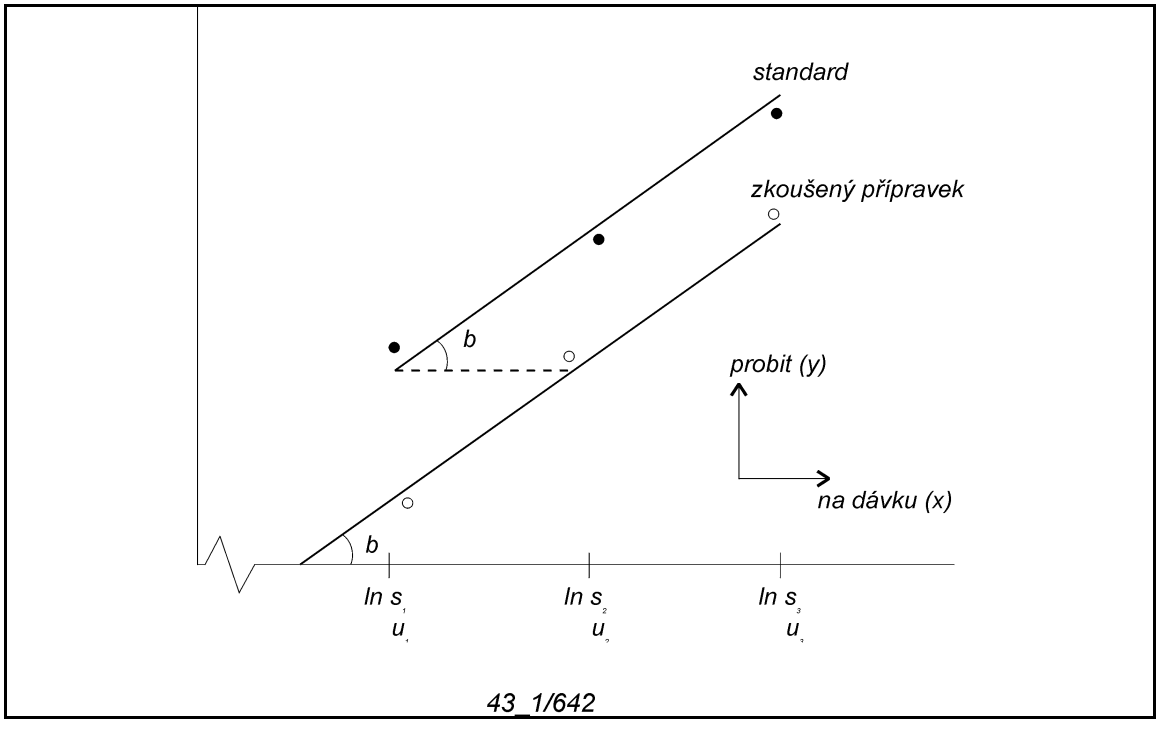
$$\frac{t^2C}{b^2}\left[\frac{1}{\Sigma_S nw} + \frac{1}{\Sigma_U nw} + \frac{(\bar{y}_S - \bar{y}_U)^2C}{b^2\Sigma S_{xx} - t^2}\right] =$$

$$= 0{,}638525\left[\frac{1}{24{,}744} + \frac{1}{24{,}672} + \frac{0{,}00293}{18{,}6868}\right] = 0{,}051786 \ ,$$

logaritmy mezí spolehlivosti jsou:

$$\ln 40 + \bar{x}_S - \bar{x}_U + C(M - \bar{x}_S + \bar{x}_U) \pm \sqrt{0{,}051786} = 3{,}7120 \pm 0{,}2276 \ .$$

Meze spolehlivosti jsou 32,6 až 51,4 jednotek na mililitr.



Obr. 4.3-I Model rovnoběžné lineární závislosti v modelu 3 + 3dávkové zkoušky s kvantální odpovědí transformovanou na probit

Na základě deklarované účinnosti A_U se pokládají logaritmy dávek u_1, u_2 a u_3 testovaného přípravku za stejné jako příslušné logaritmy dávek s_1, s_2 a s_3 standardu.

Jednotlivé dávky tvoří geometrickou řadu, tj.:

$$\ln s_2 - \ln s_1 = \ln s_3 - \ln s_2 \ .$$

Procenta odpovědí na každou dávku jsou transformována na probity a nanesena (černé body - standard a bílé - testovaný přípravek).

b = společný sklon regresních přímek pro standard a testovaný přípravek.

5 Kombinace výsledků zkoušek

5.1 Úvod

Ke splnění požadavků lékopisu je často nutné zkoušku nezávisle opakovat a výsledky kombinovat. Pak se naskytá otázka, zda je vhodné kombinovat takové zkoušky, a pokud ano, jakým způsobem.

Zkoušky lze považovat za navzájem nezávislé, když výsledky jedné zkoušky neovlivňují výsledky jiné. Také náhodné chyby ve všech faktorech ovlivňujících výsledek (např. ředění standardu a zkoušeného přípravku, citlivost biologického ukazatele) v jedné zkoušce musí být nezávislé na stejné chybě v druhé zkoušce. Zkoušky ve dnech po sobě následujících používající původní ředění standardu tedy nezávislé nejsou.

Existuje několik způsobů kombinování výsledků nezávislých zkoušek. Dále jsou popsány dvě z těchto metod. Za předpokladu, že jsou splněny nezbytné předpoklady, mohou být samozřejmě použity i jiné metody. V kapitole 5.2 je popsána metoda používající k odhadu účinnosti vážený průměr a v kapitole 5.3 metoda použitelná i v případě, že vážený průměr nelze použít.

Při kombinování odhadů účinnosti získaných pomocí modelu rovnoběžnosti je nutné pracovat s logaritmem účinnosti. Při použití modelu poměru sklonů se pracuje přímo s účinností. Protože v praxi je častější model rovnoběžnosti, užívá se pro logaritmus účinnosti symbol M. Při modelu poměru sklonů se použijí stejné vzorce, v nichž se pod M rozumí účinnost, a nikoliv její logaritmus. Před kombinováním musí být všechny odhady účinnosti upraveny na deklarovanou účinnost každého testovaného přípravku (viz příklad 3.2.8.1).

5.2 Vážený průměr účinností a jeho meze spolehlivosti založené na vnitřní variabilitě zkoušek

Podmínky použití této metody jsou:

1. odhady účinnosti jsou z nezávislých zkoušek;
2. v každé zkoušce je C menší než 1,112;
3. rozdíl mezi reziduálními rozptyly zkoušek není významný (dá se ověřit Hartleyovým nebo Bartlettovým testem);
4. jednotlivé odhady účinnosti tvoří homogenní skupinu.

Test homogenity je popsán v kapitole 5.2.1.

Pokud tyto podmínky splněny nejsou, metodu nelze použít. Metody z následující kapitoly 5.3 mohou sloužit k získání nejlepšího odhadu průměrné účinnosti jako deklarované účinnosti pro další zkoušky.

Po vyhodnocení každé z n' nezávislých validních zkoušek zkoušek je k dispozici n' hodnot M a příslušných mezí spolehlivosti získaných např. pomocí vzorce 3.2.5-4.

Pro každou zkoušku se určí délka intervalu spolehlivosti L jako rozdíl horní a dolní meze. Váha W pro každou hodnotu M se vypočte pomocí vzorce 5.2.-1, kde t je stejná hodnota jako při výpočtu mezí spolehlivosti, tj. hodnota z tabulky 6.1 s počtem stupňů volnosti odpovídajícím reziduálnímu součtu čtverců příslušné analýzy rozptylu:

$$W = \frac{4t^2}{L^2} = \frac{b^2}{s^2 C\left[\frac{1}{N_S} + \frac{1}{N_U} + \frac{(\bar{y}_S - \bar{y}_U)^2}{E - s^2 t^2}\right]} . \qquad (5.2\text{-}1)$$

(C a E viz vzorce 3.2.5-4 a 3.2.5-5).

Součiny WM se vypočtou pro každou zkoušku. Jejich součet dělený součtem vah je pak vážený průměr logaritmů účinností $\bar{M}$:

$$\bar{M} = \frac{\Sigma WM}{\Sigma W} \ . \qquad (5.2\text{-}2)$$

Směrodatná odchylka logaritmu průměrné účinnosti $s_{\bar{M}}$ je odmocnina převrácené hodnoty součtu vah:

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\Sigma W}} \ . \qquad (5.2\text{-}3)$$

Přibližné meze spolehlivosti se získají odlogaritmováním výrazu:

$$\bar{M} \pm t s_{\bar{M}} \ , \qquad (5.2\text{-}4)$$

kde t je z tabulky 6.1 s počtem stupňů volnosti rovným součtu stupňů volnosti původních zkoušek.

5.2.1 Homogenita odhadů účinnosti

Umocněním každé odchylky M od váženého průměru $\bar{M}$, vynásobením příslušnou váhou W a součtem přes všechny zkoušky se získá statistika s přibližně χ^2 rozdělením. Ta může být použita k testování homogenity odhadů logaritmů účinnosti v n' nezávislých zkouškách.

$$\chi^2 \approx \sum_{n'} W(M - \bar{M})^2 \approx \sum_{n'} (WM^2) - \frac{\left[\sum_{n'}(WM)\right]^2}{\sum_{n'} W} \qquad (5.2.1\text{-}1)$$

Je-li vypočtené χ^2 menší než tabelovaná hodnota z tabulky 6.2 (pro (n' - 1) stupňů volnosti), není významně porušena homogenita účinností a je možno použít metodu z kapitoly 5.2.

Je-li χ^2 větší než tabelovaná hodnota, jsou účinnosti nehomogenní. To znamená, že rozdíly mezi jednotlivými odhady M jsou významně větší, než odpovídá jejich mezím spolehlivosti. Rozdíly mezi zkouškami jsou tedy významné, takže podmínka 4 není splněna a vzorce 5.2-2 a 5.2-4 nejsou použitelné.

5.3 Nevážený průměr účinností a jeho meze spolehlivosti založené na variabilitě mezi zkouškami

Nejjednodušší kombinací odhadů logaritmu účinnosti M z n' zkoušek je jejich aritmetický průměr. Odhad jeho rozptylu S_M^2 se vypočte z rozptylu těchto odhadů:

$$s_M^2 = \frac{\Sigma(M - \bar{M})^2}{n' - 1} = \frac{\Sigma M^2 - \frac{(\Sigma M)^2}{n'}}{n' - 1} \qquad (5.3\text{-}1)$$

s $f = (n' - 1)$ stupni volnosti. Meze spolehlivosti se získají pomocí:

$$s_{\bar{M}}^2 = \frac{s_M^2}{n'} \qquad (5.3\text{-}2)$$

a jsou:

$$\bar{M} \pm t s_{\bar{M}} \ . \qquad (5.3\text{-}3)$$

Hodnota t z tabulky 6.1 má stejný počet stupňů volnosti jako s_M.

Protože počet stupňů volnosti je obvykle malý, je hodnota t poměrně velká, (pro $n' = 3$ a $f = 2$ je kritická hodnota t na 95% hladině významnosti rovna 4,30).

5.4 Příklad vážené průměrné účinnosti a jejich meze spolehlivosti

V tabulce 5.4-I je devět nezávislých odhadů účinnosti stejného přípravku společně s příslušnými statistickými vahami a s počtem stupňů volnosti jejich reziduálních směrodatných odchylek.

Tab. 5.4-I

Odhad účinnosti R jednotky/lékovka	$M = \ln R$	váhy W	stupně volnosti
492,3	6,199020	294,2343	32
424,4	6,050733	314,4157	32
462,4	6,136390	216,7149	33
528,8	6,270630	299,1382	36
523,7	6,260959	1034,5350	36
510,6	6,235631	242,7433	36
514,9	6,243920	397,0276	36
492,2	6,198790	366,0953	36
480,7	6,175303	1413,8330	35
Celkem		4578,7380	312

$$\bar{M} = \frac{\Sigma WM}{\Sigma W} = \frac{28\,402{,}09}{4578{,}7380} = 6{,}203039 \ .$$

Z toho plyne odlogaritmováním exp(6,203039) = 494,2 odhad počtu jednotek na lékovku.

Pomocí vzorce (5.2.1-1) se vypočte kritérium homogenity:

$$\chi^2 = 176\,194{,}4 - \left(8{,}066785 \frac{10^8}{4578{,}7380}\right) = 15{,}10938 \ .$$

Jeho hodnota je menší než kritická hodnota 15,51 s 8 stupni volnosti z tabulky 6.2, takže homogenita není významně porušena.

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{4578{,}7380}} = 0{,}01477839$$

Hodnota t pro 312 stupňů volnosti na hladině významnosti 95% je podle tabulky 6.1 rovna 1,97. 95% meze spolehlivosti pro $\bar{M}$, vypočtené pomocí 5.2-4, jsou 6,203039 - (1,97.0,01477839) a 6,203039 + (1,97.0,01477839), tj. 6,173926 a 6,232153. Meze spolehlivosti ($P = 0{,}95$) jsou tedy 480,1 až 508,8 jednotek na lékovku.

Poznámka: Protože χ^2 se počítá jako rozdíl dvou čísel s velkým počtem číslic, není vhodné hodnoty M a W zaokrouhlovat. Zaokrouhlit lze až konečný výsledek udávající počet jednotek na lékovku.

6 Tabulky

6.1 Tabulka kritických hodnot

t-rozdělení (absolutní hodnoty |t|)

	P			*P*	
f	0,95	0,99	*f*	0,95	0,99
1	12,71	63,66	18	2,10	2,88
2	4,30	9,92	19	2,09	2,86
3	3,18	5,84	20	2,09	2,85
4	2,78	4,60	21	2,08	2,83
5	2,57	4,03	22	2,07	2,82
6	2,45	3,71	23	2,07	2,81
7	2,36	3,50	24	2,06	2,80
8	2,31	3,36	25	2,06	2,79
9	2,26	3,25	26	2,06	2,78
10	2,23	3,17	27	2,05	2,77
11	2,20	3,11	28-29	2,05	2,76
12	2,18	3,06	30	2,04	2,75
13	2,16	3,01	40-43	2,02	2,70
14	2,14	2,98	57-63	2,00	2,66
15	2,13	2,95	102-126	1,98	2,62
16	2,12	2,92	600-	1,96	2,58
17	2,11	2,90			

Pravděpodobnost výskytu hodnoty |t| větší než příslušná hodnota ve sloupci pod 0,95 je rovna 0,05, ve sloupci pod 0,99 rovna 0,01.

6.2 Tabulka kritických hodnot χ^2-rozdělení

	P			*P*	
f	0,95	0,99	*f*	0,95	0,99
1	3,84	6,63	7	14,07	18,48
2	5,99	9,21	8	15,51	20,09
3	7,81	11,34	10	18,31	23,21
4	9,49	13,28	15	25,00	30,58
5	11,07	15,09	20	31,41	37,57
6	12,59	16,81	25	37,65	44,31

Pravděpodobnost výskytu hodnoty χ^2 větší než příslušná hodnota ve sloupci pod 0,95 je rovna 0,05, ve sloupci pod 0,99 rovna 0,01.

7 Slovník symbolů a popis vývojových diagramů

7.1 Slovník symbolů

Symbol	Definice
b	sklon v modelu lineární regrese v závislosti na dávce nebo logaritmu dávky, společný pro všechny přípravky ve zkoušce
$b_s...b_z$	sklony regresních přímek v modelu poměru sklonů pro každý přípravek zvlášť
d	počet dávek pro každý přípravek ve vyvážené zkoušce
e	základ přirozených logaritmů
f	počet stupňů volnosti
h	počet přípravků zkoušky, včetně standardu
k	počet různých ošetření ve zkoušce $k = dh$
n	počet opakování každého ošetření
n'	počet nezávislých odhadů účinnosti
s	odhad směrodatné odchylky - odmocnina s^2
s_1, s_2, s_3	nízká, střední a vysoká dávka standardu udaná měrnými jednotkami nebo jednotkami účinnosti. U dvoudávkových zkoušek je s_2 vysoká dávka.
s^2	odhad reziduálního rozptylu určený z analýzy rozptylu - někdy je označen indexem, např. S_M^2 je rozptyl logaritmu účinnosti M
t	Studentova testovací statistika (tabulka 6.1)
t'	Dunnettova proměnná (tabulka 3.2.4-II)
$u_1...z_3$	dávky zkoušených přípravků $\underline{U}...\underline{Z}$
w	váhový koeficient v probitové analýze (tab. 4.2-III)
y	jednotlivá odpověď nebo transformovaná odpověď
y'	vypočtená odpověď nahrazující chybějící údaj
$\bar{y}_S...\bar{y}_Z$	průměrné odpovědi standardu a zkoušených přípravků

$A_U...A_Z$ deklarované účinnosti

$B_1...B_{2n}$ celková odpověď každého jedince (od 1 do $2n$) v křížovém pokuse

B neúplná celková odpověď v bloku nebo řádku s jedním chybějícím pozorováním

C statistika užívaná pro výpočet mezí spolehlivosti (výraz 3.2.5-5). V některých textech o biologických zkouškách je významnost regrese označována g. Vztah mezi g a C je následující:

$$C = \frac{1}{1 - g}$$

$C_1...C_n$ celková odpověď v každém sloupci (1 až n) v modelu latinských čtverců

C neúplná odpověď v modelu latinských čtverců, obsahující jedno chybějící pozorování

D dávka

D_{I}, D_{II} celková odpověď v čase I nebo II v křížovém pokuse

D_i hustota odpovídající hodnotě T_i standardizované normální veličiny

E součet čtverců regrese (tabulka 3.2.3-III)

F podíl nezávislých odhadů rozptylů (tabulka 3.2.4-I)

G neúplný součet odpovědí zkoušky, vyjma chybějících pozorování

I vzdálenost sousedních logaritmů dávek

K veličina používaná k výpočtu součtu čtverců v analýze rozptylu

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N}$$

L délka intervalu spolehlivosti v logaritmech

$L_S...L_Z$ lineární kontrasty standardu a zkoušeného přípravku (tabulky 3.2.3-I a 3.2.3-III)

M odhad logaritmu účinnosti. Ve vícenásobných zkouškách se používá index k rozlišení přípravků.

M průměr několika nezávislých odhadů M

M logaritmus relativní účinnosti před použitím korekce na deklarovanou účinnost

N celkový počet odpovědí zkoušky

N_S, N_U celkový počet odpovědí přípravků $\underline{S}$ a $\underline{U}$

P pravděpodobnost

Q součet čtverců kubické regrese v analýze rozptylu (tabulky 3.2.3-II a 3.2.3-III)

$Q_S ... Q_Z$ kvadratický kontrast standardu a přípravku (tabulky 3.2.3-II a 3.2.3-III)

R odhad účinnosti - indexy jsou použity pro více zkoušených přípravků.

$R_1 ... R_n$ celková odpověď v každé řádce (1 až n) modelu latinských čtverců nebo v každém bloku modelu náhodných bloků

$\underline{S}$ standardní přípravek

S celková odpověď na standardní přípravek

S_1, S_2, S_3 celková odpověď na nízkou, střední a vysokou dávku standardu $\underline{S}$. Ve zkouškách s pouze dvěma dávkami značí S_2 vyšší dávku.

T standardizovaná normální veličina, s indexem její hodnota

T' úplný součet odpovědí ošetření, vyjma chybějících hodnot

$U ... Z$ celková odpověď zkoušených přípravků $\underline{U} ... \underline{Z}$

$\underline{U} ... \underline{Z}$ neznámé testované přípravky

U_1, U_2, U_3 celková odpověď na nízkou, střední a vysokou dávku testovaného přípravku $\underline{U}$. Ve zkouškách s pouze dvěma dávkami značí U_2 vyšší dávku - podobně pro další neznámé přípravky.

W statistické váhy používané ke kombinaci různých odhadů logaritmu účinnosti

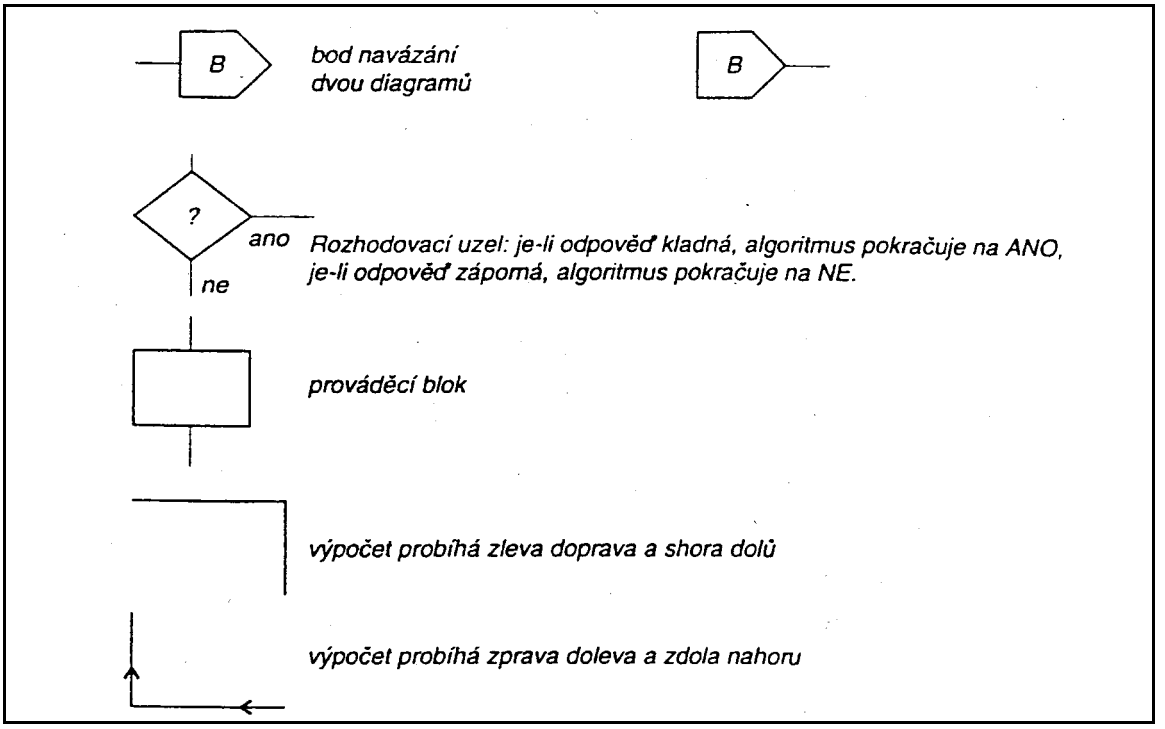
X logaritmus dávky; s indexem logaritmus dávky jednotlivých přípravků

$\bar{X}$ průměr logaritmů dávek

Y_1 maximální pracovní probit

Y_I první aproximace probitu

7.2 Popis symbolů použitých ve vývojových diagramech



Tabulka I: Omamné a psychotropní látky N

Obsahuje léčiva označená v lékopisu §§ (omamná látka) a léčiva označená § (psychotropní látka) podléhající ustanovením nařízení vlády č. 192/1988 Sb. ve znění k datu 1. 1. 1997 (182/1990 Sb., 33/1992 Sb. a 278/1993 Sb.). Uchovávají se v samostatných místnostech nebo v kovových uzamčených skříních a označují se štítky s červeným písmem na bílém podkladě. Omamné látky se navíc označují šikmým modrým pruhem.

§§ ALFENTANILIHYDROCHLORIDUM
§ ALPRAZOLAMUM
§ AMFETAMINISULFAS
§ AMOBARBITALUM
§ AMOBARBITALUMNATRICUM
§ BARBITALUM
§ BROMAZEPAMUM
§ CHLORDIAZEPOXIDIHYDROCHLORIDUM
§ CHLORDIAZEPOXIDUM
§ CLONAZEPAMUM
§§ COCAINIHYDROCHLORIDUM
§§ CODEINIDIHYDROGENOPHOSPHASHEMIHYDRICUS
§§ CODEINIDIHYDROGENOPHOSPHASSESQUIHYDRICUS
§§ CODEINUM
§§ DEXTROMORAMIDIHYDROGENOTARTRAS
§§ DEXTROPROPOXYPHENIHYDROCHLORIDUM
§ DIAZEPAMUM
§ DIKALIICLORAZEPAS
§§ DIPHENOXYLATIHYDROCHLORIDUM
§ EPHEDRINIHYDROCHLORIDUM
§ EPHEDRINIRACEMICIHYDROCHLORIDUM
§ EPHEDRINUM
§ EPHEDRINUMHEMIHYDRICUM
§§ ETHYLMORPHINIHYDROCHLORIDUM
§§ FENTANYLIDIHYDROGENOCITRAS
§ FLUNITRAZEPAMUM
§ FLURAZEPAMIMONOHYDROCHLORIDUM
§ GLUTETHIMIDUM
§ LORAZEPAMUM
§ MEPROBAMATUM
§§ METHADONIHYDROCHLORIDUM
§ METHAQUALONUM
§ METHYLPHENOBARBITALUM
§ MIDAZOLAMUM
§§ MORPHINIHYDROCHLORIDUM
§ NITRAZEPAMUM
§§ OPIUMCRUDUM
§ OXAZEPAMUM
§ PENTOBARBITALUM
§ PENTOBARBITALUMNATRICUM
§§ PETHIDINIHYDROCHLORIDUM
§ PHENOBARBITALUM
§ PHENOBARBITALUMNATRICUM
§§ PHOLCODINUM
§ TEMAZEPAMUM

Tabulka II: Venena **N**

Obsahuje léčiva velmi silně účinná (zvláště nebezpečné jedy), označená v lékopisu †† (Venenum). V lékárnách se uchovávají v uzamčené skříni (seclusa) a označují se štítky s bílým písmem na černém pozadí.

ATROPINI SULFAS
BLEOMYCINI SULFAS
BUSULFANUM
BUTYLSCOPOLAMINI BROMIDUM
CALCITRIOLUM
COLCHICINUM
COLECALCIFEROLI PULVIS
COLECALCIFEROLUM DENSATUM OLEOSUM
COLECALCIFEROLUM IN AQUA DISPERGIBILE
COLECALCIFEROLUM
CYCLOPHOSPHAMIDUM
DESLANOSIDUM
DIGITOXINUM
DIGOXINUM
DIHYDROERGOTAMINI MESILAS
DIHYDROERGOTAMINI TARTRAS
DOPAMINI HYDROCHLORIDUM
DOXORUBICINI HYDROCHLORIDUM
EPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS
ERGOMETRINI HYDROGENOMALEAS
ERGOTAMINI TARTRAS
FLUOROURACILUM
HEPARINUM CALCICUM
HEPARINUM NATRICUM
HISTAMINI DIHYDROCHLORIDUM
HISTAMINI PHOSPHAS
HOMATROPINI HYDROBROMIDUM
HOMATROPINI METHYLBROMIDUM
HYDRARGYRI DICHLORIDUM
HYOSCYAMINI SULFAS
IPRATROPII BROMIDUM
LANATOSIDUM C
LOMUSTINUM
METHYLATROPINI BROMIDUM
METHYLATROPINI NITRAS
NAPHAZOLINI HYDROCHLORIDUM
NAPHAZOLINI NITRAS
NEOSTIGMINI BROMIDUM
NEOSTIGMINI METILSULFAS
NOREPINEPHRINI HYDROCHLORIDUM
NOREPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS
ORCIPRENALINI SULFAS
OUABAINUM
PHYSOSTIGMINI SALICYLAS
PHYSOSTIGMINI SULFAS
RESERPINUM
SCOPOLAMINI HYDROBROMIDUM
TUBOCURARINI CHLORIDUM

Tabulka III: Separanda

N

Obsahuje léčiva silně účinná a žíraviny označené v lékopisu † (Separandum). V lékárnách se uchovávají odděleně od ostatních léčiv a označují se štítky s červeným písmem na bílém podkladu.

ACEBUTOLOLI HYDROCHLORIDUM
ACETAZOLAMIDUM
ACICLOVIRUM
ACIDUM ACETICUM 99%
ACIDUM AMIDOTRIZOICUM DIHYDRICUM
ACIDUM AMINOCAPROICUM
ACIDUM ETACRYNICUM
ACIDUM FOLICUM
ACIDUM FUSIDICUM
ACIDUM HYDROCHLORICUM 35%
ACIDUM IOPANOICUM
ACIDUM IOTALAMICUM
ACIDUM NALIDIXICUM
ACIDUM PHOSPHORICUM 85%
ACIDUM TIAPROFENICUM
ACIDUM TRANEXAMICUM
ACONITI RADIX
ALLOPURINOLUM
ALPRENOLOLI BENZOAS
ALPRENOLOLI HYDROCHLORIDUM
AMANTADINI HYDROCHLORIDUM
AMILORIDI HYDROCHLORIDUM
AMINOPHENAZONUM
AMINOPHYLLINUM
AMINOPHYLLINUM HYDRICUM
AMIODARONI HYDROCHLORIDUM
AMITRIPTYLINI HYDROCHLORIDUM
AMOXICILLINUM NATRICUM
AMOXICILLINUM TRIHYDRICUM
AMPICILLINUM
AMPICILLINUM NATRICUM
AMPICILLINUM TRIHYDRICUM
ANTAZOLINI HYDROCHLORIDUM
APOMORPHINI HYDROCHLORIDUM
APROTININI SOLUTIO CONCENTRATA
APROTININUM
ARGENTI NITRAS
ASTEMIZOLUM
ATENOLOLUM
AZATHIOPRINUM
BACAMPICILLINI HYDROCHLORIDUM
BACITRACINUM
BACITRACINUM ZINCICUM
BACLOFENUM
BECLOMETASONI DIPROPIONAS
BELLADONNAE FOLIUM
BELLADONNAE PULVIS NORMATUS
BENDROFLUMETHIAZIDUM
BENZATHINI BENZYLPENICILLINUM
BENZOCAINUM
BENZOYLIS PEROXIDUM CUM AQUA
BENZYLPENICILLINUM KALICUM
BENZYLPENICILLINUM NATRICUM
BETAHISTINI DIMESILAS
BETAMETHASONI ACETAS
BETAMETHASONI DIPROPIONAS
BETAMETHASONI NATRII PHOSPHAS
BETAMETHASONI VALERAS
BETAMETHASONUM
BETANIDINI SULFAS
BETAXOLOLI HYDROCHLORIDUM
BIPERIDINI HYDROCHLORIDUM
BISACODYLUM
BROMHEXINI HYDROCHLORIDUM
BROMOCRIPTINI MESILAS
BUDESONIDUM
BUMETANIDUM
BUPIVACAINI HYDROCHLORIDUM
BUSERELINUM
BUTYLHYDROXYTOLUENUM
CALCII HYDROXIDUM
CALCITONINUM SALMONIS
CARBAMAZEPINUM
CARBENICILLINUM NATRICUM
CARBIDOPUM
CARBIMAZOLUM
CARBOCISTEINUM
CARBOPLATINUM
CEFACLORUM
CEFADROXILUM
CEFALEXINUM MONOHYDRICUM

CEFALOTINUM NATRICUM
CEFAZOLINUM NATRICUM
CEFOTAXIMUM NATRICUM
CEFOXITINUM NATRICUM
CEFRADINUM
CEFTRIAXONUM NATRICUM
CEFUROXIMUM NATRICUM
CETIRIZINI DIHYDROCHLORIDUM
CHLORALI HYDRAS
CHLORAMBUCILUM
CHLORAMPHENICOLI NATRII SUCCINAS
CHLORAMPHENICOLI PALMITAS
CHLORAMPHENICOLUM
CHLORCYCLIZINI HYDROCHLORIDUM
CHLOROBUTANOLUM
CHLOROBUTANOLUM HEMIHYDRICUM
CHLOROCRESOLUM
CHLOROQUINI DIPHOSPHAS
CHLOROQUINI SULFAS
CHLOROTHIAZIDUM
CHLORPHENAMINI HYDROGENOMALEAS
CHLORPROMAZINI HYDROCHLORIDUM
CHLORPROPAMIDUM
CHLORPROTHIXENI HYDROCHLORIDUM
CHLORTALIDONUM
CHLORTETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM
CICLOSPORINUM
CIMETIDINUM
CINCHOCAINI HYDROCHLORIDUM
CINNARIZINUM
CIPROFLOXACINI HYDROCHLORIDUM
CIPROFLOXACINUM
CISAPRIDUM
CISPLATINUM
CLINDAMYCINI DIHYDROGENOPHOSPHAS
CLINDAMYCINI HYDROCHLORIDUM
CLOBETASONI BUTYRAS
CLOFIBRATUM
CLOMIFENI DIHYDROGENOCITRAS
CLOMIPRAMINI HYDROCHLORIDUM
CLONIDINI HYDROCHLORIDUM
CLOROXINUM
CLOTRIMAZOLUM
CLOXACILLINUM NATRICUM
COFFEINUM
COFFEINUM MONOHYDRICUM
COLISTIMETHATUM NATRICUM
COLISTINI SULFAS
CORTICOTROPINUM
CORTISONI ACETAS
CUPRI SULFAS
CUPRI SULFAS PENTAHYDRICUS
CYANOCOBALAMINUM
CYCLIZINI HYDROCHLORIDUM
CYCLOPENTOLATI HYDROCHLORIDUM
CYPROHEPTADINI HYDROCHLORIDUM
CYPROTERONI ACETAS
CYSTEINI HYDROCHLORIDUM
CYTARABINUM
DACARBAZINUM
DAPSONUM
DAUNORUBICINI HYDROCHLORIDUM
DEFEROXAMINI MESILAS
DEMECLOCYCLINI HYDROCHLORIDUM
DESIPRAMINI HYDROCHLORIDUM
DESMOPRESSINUM
DESOXYCORTONI ACETAS
DEXAMETHASONI ACETAS
DEXAMETHASONI NATRII PHOSPHAS
DEXAMETHASONUM
DIAZOXIDUM
DIBUTYLIS PHTHALAS
DICLOFENACUM NATRICUM
DICLOXACILLINUM NATRICUM
DIENESTROLUM
DIETHYLSTILBESTROLUM
DIFLUNISALUM
DIGITALIS PURPUREAE FOLIUM
DIHYDROERGOTAMINI TARTRAS
DIHYDROSTREPTOMYCINI SULFAS
DILTIAZEMI HYDROCHLORIDUM
DIMENHYDRINATUM
DIMERCAPROLUM
DIMETHYLIS SULFOXIDUM
DIPHENHYDRAMINI HYDROCHLORIDUM
DIPROPHYLLINUM

DISOPYRAMIDI
DIHYDROGENOPHOSPHAS
DISOPYRAMIDUM
DISULFIRAMUM
DOMPERIDONI HYDROGENOMALEAS
DOMPERIDONUM
DOSULEPINI HYDROCHLORIDUM
DOXEPINI HYDROCHLORIDUM
DOXYCYCLINI HYCLAS
DOXYCYCLINUM
DROPERIDOLUM
ECONAZOLI NITRAS
EMETINI DIHYDROCHLORIDUM HEPTAHYDRICUM
EMETINI DIHYDROCHLORIDUM PENTAHYDRICUM
ENOXAPARINUM NATRICUM
ERGOCALCIFEROLUM
ERYTHROMYCINI ESTOLAS
ERYTHROMYCINI ETHYLSUCCINAS
ERYTHROMYCINI LACTOBIONAS
ERYTHROMYCINI STEARAS
ERYTHROMYCINUM
ESTRADIOLI BENZOAS
ESTRADIOLUM HEMIHYDRICUM
ETHAMBUTOLI HYDROCHLORIDUM
ETHINYLESTRADIOLUM
ETHIONAMIDUM
ETHISTERONUM
ETHOSUXIMIDUM
ETHYLIS BISCOUMACETAS
ETOFYLLINUM
ETOPOSIDUM
FAMOTIDINUM
FELODIPINUM
FENOTEROLI HYDROBROMIDUM
FLUCLOXACILLINUM NATRICUM
FLUCYTOSINUM
FLUDROCORTISONI ACETAS
FLUOCINOLONI ACETONIDUM
FLUOXETINI HYDROCHLORIDUM
FLUPHENAZINI DECANOAS
FLUPHENAZINI DIHYDROCHLORIDUM
FLUPHENAZINI ENANTAS
FRAMYCETINI SULFAS
FUROSEMIDUM
GALLAMINI TRIETHIODIDUM
GENTAMICINI SULFAS
GLIBENCLAMIDUM
GLIPIZIDUM
GLUCAGONUM
GONADORELINUM
GONADOTROPINUM CHORIONICUM
GONADOTROPINUM SERICUM EQUINUM AD U.V.
GRAMICIDINUM
GRISEOFULVINUM
GUAIFENESINUM
GUANETHIDINI SULFAS
HALOPERIDOLUM
HEPARINA MASSAE MOLECULARIS MINORIS
HEXOBARBITALUM
HISTIDINI HYDROCHLORIDUM MONOHYDRICUM
HISTIDINUM
HYALURONIDASUM
HYDRALAZINI HYDROCHLORIDUM
HYDROCHLOROTHIAZIDUM
HYDROCORTISONI ACETAS
HYDROCORTISONI HEMISUCCINAS
HYDROCORTISONUM
HYDROXOCOBALAMINI ACETAS
HYDROXOCOBALAMINI HYDROCHLORIDUM
HYDROXOCOBALAMINI SULFAS
HYDROXYZINI HYDROCHLORIDUM
HYMECROMONUM
HYOSCYAMI FOLIUM
HYOSCYAMI PULVIS NORMATUS
IDOXURIDINUM
IMIPRAMINI HYDROCHLORIDUM
INDAPAMIDUM
INDOMETACINUM
INSULINUM HUMANUM
INSULINUM
INTERFERONI ALFA-2 SOLUTIO CONCENTRATA
IODUM
IOHEXOLUM
IOPAMIDOLUM
IPECACUANHAE PULVIS NORMATUS
IPECACUANHAE RADIX
ISOCONAZOLI NITRAS

ISOCONAZOLUM
ISONIAZIDUM
ISOPRENALINI SULFAS
ISOSORBIDI DINITRAS DILUTUS
ISOSORBIDI MONONITRAS DILUTUS
ISOTRETINOINUM
ISOXSUPRINI HYDROCHLORIDUM
KALII CLAVULANAS
KALII HYDROXIDUM
KALII PERCHLORAS
KANAMYCINI MONOSULFAS
KANAMYCINI SULFAS ACIDUS
KETAMINI HYDROCHLORIDUM
KETOCONAZOLUM
KETOPROFENUM
LABETALOLI HYDROCHLORIDUM
LEVAMISOLI HYDROCHLORIDUM
LEVODOPUM
LEVOMEPROMAZINI HYDROCHLORIDUM
LEVOMEPROMAZINI HYDROGENOMALEAS
LEVONORGESTRELUM
LEVOTHYROXINUM NATRICUM
LIDOCAINI HYDROCHLORIDUM
LIDOCAINUM
LINCOMYCINI HYDROCHLORIDUM MONOHYDRICUM
LINDANUM
LIOTHYRONINUM NATRICUM
LITHII CITRAS
LOPERAMIDI HYDROCHLORIDUM
LYNESTRENOLUM
LYPRESSINI SOLUTIO INIECTABILIS
MEBENDAZOLUM
MECLOZINI DIHYDROCHLORIDUM
MEDOSULEPINI HYDROCHLORIDUM
MEDROXYPROGESTERONI ACETAS
MEPYRAMINI HYDROGENOMALEAS
MERCAPTOPURINUM
MESTRANOLUM
METFORMINI HYDROCHLORIDUM
METHOTREXATUM
METHYLDOPUM
METHYLPREDNISOLONI ACETAS
METHYLPREDNISOLONI HYDROGENOSUCCINAS
METHYLPREDNISOLONUM
METHYLTESTOSTERONUM
METHYLTHIONINII CHLORIDUM AD USUM EXTERNUM
METIPRANOLOLUM
METOCLOPRAMIDI HYDROCHLORIDUM
METOPROLOLI TARTRAS
METRONIDAZOLI BENZOAS
METRONIDAZOLUM
MEXILETINI HYDROCHLORIDUM
MIANSERINI HYDROCHLORIDUM
MICONAZOLI NITRAS
MICONAZOLUM
MINOCYCLINI HYDROCHLORIDUM
MINOXIDILUM
NADROPARINUM CALCICUM
NALOXONI HYDROCHLORIDUM
NAPROXENUM
NATRII AMIDOTRIZOAS
NATRII CALCII EDETAS
NATRII FLUORIDUM
NATRII FUSIDAS
NATRII HYDROXIDUM
NATRII PICOSULFAS
NATRII VALPROAS
NEOMYCINI SULFAS
NICETHAMIDUM
NICLOSAMIDUM
NICLOSAMIDUM MONOHYDRICUM
NICOTINAMIDUM
NIFEDIPINUM
NITROFURALUM
NITROFURANTOINUM
NORETHISTERONI ACETAS
NORETHISTERONUM
NORGESTRELUM
NORTRIPTYLINI HYDROCHLORIDUM
NOSCAPINI HYDROCHLORIDUM
NOSCAPINUM
NYSTATINUM
OMEPRAZOLUM
OMEPRAZOLUM NATRICUM
ORNIDAZOLUM
OXPRENOLOLI HYDROCHLORIDUM
OXYPHENBUTAZONUM

OXYTETRACYCLINI
HYDROCHLORIDUM
OXYTETRACYCLINUM
OXYTOCINI SOLUTIO CONCENTRATA
OXYTOCINUM
PANCURONII BROMIDUM
PAPAVERINI HYDROCHLORIDUM
PARALDEHYDUM
PENICILLAMINUM
PENTAMIDINI DIISETIONAS
PENTOXIFYLLINUM
PERPHENAZINUM
PHENACETINUM
PHENAZONUM
PHENOLSULFOPHTHALEINUM
PHENOLUM
PHENOXYMETHYLPENICILLINUM
PHENOXYMETHYLPENICILLINUM
KALICUM
PHENTOLAMINI MESILAS
PHENYLBUTAZONUM
PHENYLEPHRINI HYDROCHLORIDUM
PHENYLEPHRINUM
PHENYLHYDRARGYRI BORAS
PHENYLHYDRARGYRI NITRAS
PHENYLPROPANOLAMINI
HYDROCHLORIDUM
PHENYTOINUM NATRICUM
PHTHALYLSULFATHIAZOLUM
PHYTOMENADIONUM
PILOCARPINI HYDROCHLORIDUM
PILOCARPINI NITRAS
PINDOLOLUM
PIPERAZINI ADIPAS
PIPERAZINI CITRAS
PIPERAZINUM HEXAHYDRICUM
PIROXICAMUM
PIVAMPICILLINUM
PLUMBI ACETAS
POLYMYXINI B SULFAS
PRAZIQUANTELUM
PRAZOSINI HYDROCHLORIDUM
PREDNISOLONI ACETAS
PREDNISOLONI NATRII PHOSPHAS
PREDNISOLONI PIVALAS
PREDNISOLONUM
PREDNISONUM
PRIMAQUINI DIPHOSPHAS
PRIMIDONUM
PROBENECIDUM
PROCAINAMIDI HYDROCHLORIDUM
PROCAINI BENZYLPENICILLINUM
PROCAINI HYDROCHLORIDUM
PROCHLORPERAZINI
HYDROGENOMALEAS
PROGESTERONUM
PROMETHAZINI HYDROCHLORIDUM
PROPANTHELINI BROMIDUM
PROPRANOLOLI HYDROCHLORIDUM
PROPYLTHIOURACILUM
PROPYPHENAZONUM
PROTAMINI HYDROCHLORIDUM
PROTAMINI SULFAS
PROTIRELINUM
PROXYPHYLLINUM
PYRAZINAMIDUM
PYRIDOXINI HYDROCHLORIDUM
PYRIMETHAMINUM
QUINIDINI SULFAS
RANITIDINI HYDROCHLORIDUM
RESORCINOLUM
RIBOFLAVINI NATRII PHOSPHAS
RIBOFLAVINUM
RIFAMPICINUM
RIFAMYCINUM NATRICUM
ROXITHROMYCINUM
SALBUTAMOLI SULFAS
SALBUTAMOLUM
SELENII DISULFIDUM
SERTACONAZOLI NITRAS
SINAPIS ETHEROLEUM ARTIFICIALE
SOMATOSTATINUM
SOMATROPINI SOLUTIO AD
PRAEPARATIONEM
SOMATROPINUM
SOMATROPINUM PRO INIECTIONE
SPECTINOMYCINI HYDROCHLORIDUM
SPIRAMYCINUM
SPIRONOLACTONUM
STRAMONII FOLIUM
STRAMONII PULVIS NORMATUS
STREPTOKINASUM
STREPTOMYCINI SULFAS
STRYCHNI SEMEN

SUCCINYLSULFATHIAZOLUM
SULFACETAMIDUM NATRICUM
SULFADIAZINUM
SULFADIMIDINUM
SULFADOXINUM
SULFAFURAZOLUM
SULFAMERAZINUM
SULFAMETHIZOLUM
SULFAMETHOXAZOLUM
SULFAMETHOXYPYRIDAZINUM
SULFASALAZINUM
SULFATHIAZOLUM
SULFINPYRAZONUM
SULFISOMIDINUM
SULINDACUM
SULPIRIDUM
SUXAMETHONII CHLORIDUM
SUXAMETHONII IODIDUM
TAMOXIFENI DIHYDROGENOCITRAS
TENOXICAMUM
TERBUTALINI SULFAS
TESTOSTERONI ENANTAS
TESTOSTERONI ISOBUTYRAS
TESTOSTERONI PROPIONAS
TETRACAINI HYDROCHLORIDUM
TETRACOSACTIDUM
TETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM
TETRACYCLINUM
THEOBROMINUM
THEOPHYLLINUM
THEOPHYLLINUM MONOHYDRICUM
THIAMINI HYDROCHLORIDUM
THIAMINI NITRAS
THIAMPHENICOLUM
THIOPENTALUM NATRICUM ET NATRII CARBONAS
THIORIDAZINI HYDROCHLORIDUM
TIABENDAZOLUM
TICARCILLINUM NATRICUM
TICLOPIDINI HYDROCHLORIDUM
TIMOLOLI HYDROGENOMALEAS
TINIDAZOLUM
TOBRAMYCINUM
TOCOFEROLI ALFA ACETAS
TOCOFEROLI ALFA ACETATIS PULVIS
TOCOFEROLUM ALFA
TOLBUTAMIDUM
TOSYLCHLORAMIDUM NATRICUM
TRETINOINUM
TRIAMCINOLONI ACETONIDUM
TRIAMCINOLONI HEXACETONIDUM
TRIAMCINOLONUM
TRIAMTERENUM
TRIFLUOPERAZINI HYDROCHLORIDUM
TRIMECAINI HYDROCHLORIDUM
TRIMETHADIONUM
TRIMETHOPRIMUM
TRIMIPRAMINI HYDROGENOMALEAS
TROPICAMIDUM
UROFOLLITROPINUM
UROKINASUM
VANCOMYCINI HYDROCHLORIDUM
VERAPAMILI HYDROCHLORIDUM
VERATRI ALBI RADIX
VINBLASTINI SULFAS
VINCRISTINI SULFAS
VITAMINUM A
VITAMINUM A DENSATUM OLEOSUM
VITAMINUM A IN AQUA DISPERGIBILE
VITAMINI A PULVIS
WARFARINUM NATRICUM
WARFARINUM NATRICUM CLATHRATUM
XANTINOLI NICOTINAS
XYLOMETAZOLINI HYDROCHLORIDUM
ZIDOVUDINUM
ZINCI CHLORIDUM
ZOPICLONUM

Tabulka IV: Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé N

Tabulka obsahuje doporučené terapeutické dávky tak, jak byly odvozeny z klinických studií a jak je upravila klinická zkušenost. Jsou uvedeny jako dávky podávané jednorázově (**jednotlivá terapeutická dávka**) nebo dávky na den (**denní terapeutická dávka**) pro dospělého člověka. Hlavním zdrojem pro sestavení tabulky se stala literatura [1)] a lékopisné údaje.

Terapeutické dávky jsou uvedeny pro orientaci lékaře a lékárníka. Lékař určuje dávku často velmi rozdílnou podle požadovaného terapeutického účinku, vnímavosti nemocného, jeho tělesné hmotnosti, celkového stavu, trvání léčby atd. Obvyklé terapeutické dávky uvedené v tabulce odpovídají průměrnému dávkování a jsou myšleny jako povšechné vodítko.

Tabulka obsahuje v poznámce u silně účinných léčiv také **maximální dávku,** pokud byla stanovena. Maximální dávky léčiv jsou takové dávky pro člověka, které nesmí lékárník při vydávání léčiv překročit jak pro jednotlivé podání *(maximální dávka jednotlivá),* tak pro podání během 24 hodin *(maximální dávka denní)*, pokud to lékař zřetelně neoznačil v předpisu. Vyšší dávky než maximální smí lékař podat pouze výjimečně a musí si být vědom, že záměrně překračuje maximální dávku. Překročí-li lékař úmyslně z terapeutického důvodu ve svém předpisu stanovenou maximální dávku, musí ji na předpisu vypsat též slovy a připojit k číslu (!). Je-li v předpise překročena maximální dávka a není-li toto překročení lékařem řádně označeno vykřičníkem a vypsáním dávky slovy, požádá lékárník příslušného lékaře o doplnění. V případě nedosažitelnosti lékaře opraví lékárník dávku na obvyklou terapeutickou, úpravu potvrdí svým podpisem a dodatečně lékaře o změně uvědomí.

Předepíše-li lékař lék obsahující silně účinné léčivo, pro které stanoví lékopis maximální dávku, uvede na předpisu způsob použití léku i přesný návod, který umožňuje výpočet jednotlivých i denních dávek při předepsaném použití. Pro výpočet dávek léků užívaných po lžičkách apod. platí toto ustanovení, není-li uvedeno jinak:

1 kapka	-	0,05 ml
1 čajová nebo kávová lžička	-	5 ml
1 dezertní nebo dětská lžička	-	10 ml
1 polévková lžíce	-	15 ml

Maximální dávky uvedené v tabulce jsou stanoveny podle klinických zkušeností a mají za účel zabránit otravám, ke kterým by mohlo dojít přepsáním nebo jiným omylem. Nejsou to hraniční hodnoty, po jejichž překročení by nutně musela nastat otrava, a nemají tedy omezovat lékaře v jeho uváženém dávkování. Např. při antagonizování účinku některých jedů se běžně překračují maximální dávky antidot (atropin při otravách organofosfáty, kofein při otravách alkoholem aj.).

[1)] Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 31st Ed. London, The Pharmaceutical Press 1996.

Použité zkratky v tabulkách dávek léčiv

cont.inf - kontinuálně infuzí
D.L. - dávka smrtelná
d.max. - dávka maximální
d.max.p.d. - maximální dávka denní
d.max.s. - maximální dávka jednotlivá
d.pro die - dávka denní
d.proph. - dávka profylaktická
d.sing. - dávka jednotlivá
d.therap. - dávka terapeutická
d.tox. - dávka toxická
dosis - dávka
ext. - externě
inj. - injekčně, injekční
i.m. - intramuskulárně
i.v. - intravenózně
inf. - infuzí
inhal. - inhalačně
intermit.inf.- intermitentně infuzí
intraart. - intraarteriálně
intraartic. - intraartikulárně
intraauric. - do ucha
intracard. - intrakardiálně
intracor. - intrakoronárně
intraderm. - intradermálně
intramam. - intramamárně
intranas. - intranazálně
intraocul. - intraokulárně
intrapleur. - intrapleurálně
intrarum. - do bachoru
intrathec. - intrathekálně
intrauter. - do dělohy
loc. - lokálně
nasogastr. - nazogastrálně
nebul. - nebulizovaný roztok
p.o. - perorálně
p.rect. - rektálně
s.c. - subkutánně
subling. - sublingválně
transderm. - transdermálně
vagin. - vaginálně
G5 - infuzní 5% roztok glukosy
F1/1 - infuzní izotonický roztok chloridu sodného

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
ABSINTHII HERBA	p.o.	1,0	2,0 - 3,0	
ACEBUTOLOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,2 - 0,8	1,2	
ACETAZOLAMIDUM	p.o.	0,25 - 0,5	1,0 - 1,5	
	i.v.	0,25	1,5	
ACETYLCYSTEINUM	p.o.	0,2	0,8	
	inhal.	0,4	0,3 - 1,6	ve vodném roztoku
ACICLOVIRUM	p.o.	0,2 - 0,8	1,0 - 4,0	
	loc.	5% mast		5 - 6x denně, 5 - 10 dní
	i.v.	0,25 - 0,5/m^2	0,75 - 1,5/m^2	
ACIDUM ACETYLSALICYLICUM	p.o., p.rect.	0,5 - 1,0	a 4,0	analgetikum, antipyretikum
ACIDUM AMINOCAPROICUM	p.o.	4,0 - 5,0		úvodní dávka
		1,0 - 1,25		pokračování dávek (po 1 h) - max. 30 g/24 h
ACIDUM ASCORBICUM	p.o.		0,05 - 0,1	profylakticky
		0,1 - 0,5	0,5 - 1,0	terapeuticky
	i.v.		0,5 - 1,0	při methemoglobinemii, pomalu
ACIDUM BENZOICUM	ext.	6% mast		obvykle s 3 % kyseliny salicylové
ACIDUM BORICUM	loc.	1,6 - 1,7% oční kapky		
		3 - 10% mast		
ACIDUM ETACRYNICUM	p.o.	0,05 - 0,2	0,05 - 0,4	
	i.v.	0,05		
ACIDUM FOLICUM	p.o.	0,01 - 0,02 obden		úvodní dávka
		0,005		udr ovací dávka
ACIDUM FUSIDICUM	p.o.	0,5	1,5	
	i.v. inf.	0,5	1,5	
	loc.	2% lékové formy		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
ACIDUM NALIDIXICUM	p.o.	1,0	4,0	
ACIDUM NICOTINICUM	p.o.	0,2 - 2,0	0,4 - 6,0	postupně zvyšovat a na 6,0
ACIDUM TIAPROFENICUM	p.o.	0,2 - 0 ,3	0,6	
	p.rect.	0,3	0,6	
ACIDUM UNDECYLENICUM	loc.	5% mast		2x denně
ACONITI RADIX	p.o.	0,02	0,06	
AGRIMONIAE HERBA	p.o.	1,5	3,0 - 4,5	
ALBUMINI HUMANI SOLUTIO	i.v.	5% roztok rychlostí 1 - 2 ml/min	500 ml	základní infuze
		20 - 25% roztok rychlostí 1 ml/min	100 ml	základní infuze
ALFENTANILI HYDROCHLORIDUM	i.v.	0,5 mg během 30 s, ev. dalších 0,25 mg		při spontánní respiraci
	i.v.	30 - 50 mg/kg		řízené dýchání
	inf.	50 - 100 mg/kg		bolus
		0,5 - 1,0 mg/kg/min		pokračování
ALGELDRATUM	p.o.	0,25 - 1,0	1,0	
ALLOPURINOLUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,4 - 0,6	
ALOE BARBADENSIS	p.o.	0,05	0,2	
ALOE CAPENSIS	p.o.	0,05	0,2	
ALOE EXTRACTUM SICCUM NORMATUM	p.o.	0,05	0,2	
ALOXIPRINUM	p.o.	0,4 - 0,8	1,2 - 2,4	
			a 0,08 - 0,16/kg	revmatická horečka (ve 4 dílčích dávkách)
ALPRAZOLAMUM	p.o.	0,25 - 2,0 mg	1,5 - 4,0 mg	
ALPRENOLOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,2 - 0,8	
ALTHAEAE FOLIUM	p.o.	1,5	4,5	
ALTHAEAE RADIX	p.o.	0,5 - 3,0	15,0	
ALUMINII SULFAS	ext.	20% roztok		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
AMANTADINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4	
AMFETAMINI SULFAS	p.o.	0,005 - 0,01	0,005 - 0,02	nutná individualizace dávek, max. 0,02
AMILORIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,005 - 0,015	
AMINOPHENAZONUM	p.o., i.v.	0,3 - 0,45	0,3 - 0,9	
AMINOPHYLLINUM	p.o.	0,1 - 0,3	0,3 - 1,2	neretardované formy, d.max.s. 0,5; d.max.p.d. 1,5
		0,175 - 0,7	0,35 - 1,4	retardované formy
	i.v.	0,25 a 0,5 infuze průměrnou rychlostí 0,6 mg/kg/h, která navazuje na i.v. bolus 0,005/kg.	0,25 - 1,5	
AMIODARONI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,2 - 0,4	0,2 - 1,2	nutná individualizace dávek
	i.v.	infuze 0,005/kg během 20 min a 2 h v G5	0,6 - 0,8 (a 1,2)	
AMITRIPTYLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,15 - 0,20	
	i.m.	0,01 - 0,03	0,04 - 0,12	
AMMONII CHLORIDUM	p.o.	1,0 - 2,0 po 6 h	4,0 - 8,0	
	i.v.	1 - 2% roztok		podle stavu nemocného (terapie alkalózy)
AMOBARBITALUM NATRICUM	p.o., i.m., i.v.	0,065 - 0,25		na noc
AMOXICILLINUM NATRICUM	p.o.	0,25 - 0,5	0,75 - 1,5	při léčbě kapavky a 3 g jednorázově
AMPICILLINUM NATRICUM	p.o.	0,25 - 0,5	2,0 - 6,0	
	i.v., i.m.	0,5	2,0 - 6,0	
ANISI ETHEROLEUM	p.o.	0,15 - 1,0	0,3	
ANISI FRUCTUS	p.o.	1,5	3,0	
ANISI STELLATI FRUCTUS	p.o.	0,75	1,5	
ANTAZOLINI HYDROCHLORIDUM	intranas.	0,5% roztok		
	intraocul.	0,5% roztok		
	ext.	1,8% krém		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
ANTITHROMBINUM III HUMANUM DENSATUM CRYODESSICATUM	i.v.		3 tis. m.j.	podle stavu a diagnózy - akutní trombóza a preoperační profylaxe
	i.v.	3 tis. m.j.		kloubní náhrada - 2 h před operací
			2 tis. m.j./den	kloubní náhrada - 5 dní po operaci
APOMORPHINI HYDROCHLORIDUM	s.c.	0,005	0,005 - 0,01	
APROTININI SOLUTIO CONCENTRATA	i.v.	200 - 500 tis. m.j., poté infuze rychlostí 50 tis. m.j./h do zástavy krvácení		zástava krvácení
		100 - 200 tis. m.j.		profylaxe hyperfibrinolytického krvácení
		100 tis. m.j. bolus, poté 200 - 300 tis. m.j. během 3 - 4 h		antidotum fibrinolytické léčby
ARGENTI NITRAS	loc.	0,5 - 1,0% roztoky		max. 0,03 - 0,1(oční kapky)
ARGININI HYDROCHLORIDUM	i.v. inf.	10% roztok 30 g během 30 min		diagnostický test
	i.v. inf.	10 g během 30 min		forsírovaná diuréza
ASTEMIZOLUM	p.o.		0,01	
ATENOLOLUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,05 - 0,1	
	i.v.	0,005 (během 5 min), popř. dalších 0,005 (po 10 min)		i.v. způsob podání se pou ívá při léčbě hemodynamicky stabilizovaného akutního infarktu myokardu
ATROPINI SULFAS	loc.	0,5 - 1,0% oční kapky		max.: p.o. 0,005 - 0,01; p.rect. 0,002 - 0,004; oční kapky 0,001 - 0,003
	p.o., i.m., s.c.	0,5 - 1,0 mg	0,002	
	i.v.	0,002	a 0,2	otrava organofosfáty (opakovat v 5min intervalech do odstranění muskarinových projevů)
AURANTII PERICARPIUM DULCE	p.o.	1,5	5,0	
AZATHIOPRINUM	p.o. (i.v.)		0,001 - 0,005/kg	imunosupresivum
			0,001 - 0,0025/kg	antirevmatikum
BACAMPICILLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,4 - 0,6	0,8 - 1,6	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
BACITRACINUM	loc.	250 - 400 m.j./1 g masti		
		250 m.j./1 ml v očních kapkách		
BACLOFENUM	p.o.	0,005 - 0,015	0,03 - 0,075	
BALSAMUM PERUVIANUM	loc.			5 - 20 % v přípravku
BALSAMUM TOLUTANUM	p.o.	0,2	0,6	
BARBITALUM	p.o.	a 0,3 - 0,6		
BARII SULFAS	p.o.			vodná suspenze 3 : 1, vyšetření aludku a střeva - suspenze 1 : 1
	p.rect.			irigoskopické vyšetření - suspenze 1 : 3
BECLOMETASONI DIPROPIONAS	inhal.		0,4	rozděleno do 2 - 4 dílčích dávek
BELLADONNAE FOLIUM	p.o.	0,05	0,15	max. 0,2 - 0,6
BELLADONNAE PULVIS NORMATUS	p.o.	0,05	0,15	max. 0,2 - 0,6
BENDROFLUMETHIAZIDUM	p.o.	0,0025 - 0,01	0,0025 - 0,01	
BENZALKONII CHLORIDI SOLUTIO	ext.	0,01 - 0,1% roztok		
	instilace do močového měchýře	0,005% roztok		
BENZATHINI BENZYLPENICILLINUM	i.m.		0,6 - 1,2 mil. m.j. jednou za 14 dnů	prevence streptokokových onemocnění
BENZETHONII CHLORIDUM	ext.	0,5% roztok		
BENZOCAINUM	loc.	max. 20% lékové formy		k povrchové anestezii
BENZYLIS BENZOAS	ext.	a 0,3 - 0,6		
BENZYLPENICILLINUM KALICUM			25 - 100 tis. m.j. podle záva nosti onemocnění	ve 4 - 6 dílčích dávkách
BETACAROTENUM	p.o.		0,03 - 0,3	
BETAHISTINI DIMESILAS	p.o.	0,008 - 0,016	0,024 - 0,48	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
BETAMETHASONI ACETAS	p.o.		0,5 - 5,0 (10,0) mg	Dávkování je přísně individuální.
	i.m., i.v.		0,004 - 0,02	
	intraartic.	0,004 - 0,006		
	loc.	0,025 - 0,05% lékové formy		
BETAXOLOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,01 - 0,02	0,01 - 0,02	
	loc.	0,5% oční kapky		
BETULAE FOLIUM	p.o.	2,0 - 3,0	6,0 - 9,0	
BIPERIDENI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,001 - 0,002	0,003 - 0,012	
	i.m., i.v.	0,002		max. 4 dávky v 0,5h intervalech
BISACODYLUM	p.o.	0,01		
	p.rect.	0,01		
BLEOMYCINI SULFAS	i.m., i.v., s.c.	0,25 - 0,5 m.j./kg 1 - 2x týdně		Celková dávka by neměla překročit 400 m.j.
			1 m.j./den nebo 5 m.j./týden	udr ovací dávka
BOLDO FOLIUM	p.o.	1,0	2,0 - 5,0	
BROMAZEPAMUM	p.o.		0,003 - 0,018	max. 0,5 uvedené dávky u starých nemocných
BROMHEXINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,008 - 0,016	0,024 - 0,048	
	i.m.	0,004	0,008 - 0,012	
BROMOCRIPTINI MESILAS	p.o.	1,25 - 2,5 mg	0,005 - 0,0075	hyperprolaktinemie (Dávkování je přísně individuální.)
		1,25 - 10,0 mg	0,02 - 0,03	akromegalie (Dávkování je přísně individuální.)
		1,25 - 10,0 mg	0,01 - 0,04	Parkinsonova nemoc (Dávkování je přísně individuální.)
BUDESONIDUM	inhal. (aerosol)	0,2 mg	0,4 mg, ev. a 1,6 mg	
	inhal. (nebul.)	0,001 - 0,002	0,002 - 0,004	úvodní dávka
		0,5 - 1,0 mg	0,001 - 0,002	udr ovací dávka
	intranas.	0,1 mg	0,2 mg	do ka dé nosní dírky
	loc.	0,025% mast		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
BUMETANIDUM	p.o.	0,5 - 2,0 mg	0,01	
	i.v., i.m.	0,5 - 1,0 mg		mo no zopakovat za 2 - 3 h
BUPIVACAINI HYDROCHLORIDUM	inj.	0,25 - 0,75% roztoky	max. 0,4	
BUSULFANUM	p.o.	0,004 - 0,006	0,06 mg/kg (max. 0,006)	chronická granulocytární leukemie
			0,006 - 0,008	refrakterní případy
			0,5 - 2 mg/den	prevence relapsu
BUTAMIRATI DIHYDROGENOCITRAS	p.o.	0,005 - 0,01; 0,05	0,035 - 0,150	depot
	i.v.	0,01 - 0,02	0,05	před bronchoskopií, dále 0,01 po 4 h
BUTYLSCOPOLAMINI BROMIDUM	i.v., i.m.	0,02		lze opakovat po 30 min
	p.o.	0,02	0,08	
CALCII CARBONAS	p.o.	1,0	max. 8,0	
CALCII CHLORIDUM HEXAHYDRICUM	i.v.	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0	
CALCII DOBESILAS	p.o.	0,25	0,5 - 1,0	
	loc.	4%		
CALCII FOLINAS	i.v. inf.	0,075/12 h		dále 12 mg i.m. 4 dávky po 6 h (po velkých dávkách methotrexátu): předávkování antagonistů kyseliny listové (tě ká otrava)
	i.m.	0,006 - 0,012	0,024 - 0,048	mírnější otrava - 4 dávky po 6 h
	i.v. inf., i.m.	0,15 během 12 - 24 h		při podání s methotrexátem (24 h po podání methotrexátu)
	i.m.	dále 0,012 - 0,015		
	p.o.	nebo 0,015	0,06	po dobu 48 - 72 h
	i.v.	0,200/m^2		při podání s fluorouracilem po dobu 5 dní (v intervalu 21 - 28 dní)
	p.o.	0,015		anémie
	i.m.	nebo do 0,001		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
CALCII GLUCONAS	p.o.	1,5 - 2,0	4,5 - 6,0	
CALCII GLUCONAS PRO INIECTIONE	i.v.	1,5 - 2,0	4,5 - 6,0	
CALCITONINUM SALMONIS	s.c., i.m.	50 m.j. 3x/týden - 100 m.j./den		Pagetova nemoc
	s.c., i.m.		100 m.j.	nervové komprese (3 - 6 měsíců)
	s.c., i.m.	400 m.j.	1200 - 1600 m.j.	hyperkalcemie
	s.c., i.m.		100 m.j.	postmenopauzální osteoporóza (spolu s kalciem)
CALCITRIOLUM	p.o., i.v.	0,25 - 3,0 mg	0,5 - 3,0 mg	výrazně individuální
CAMPHORA RACEMICA	loc.	max. 25 % v přípravcích		
CAPTOPRILUM	p.o.	6,25 - 12,5 mg	50,0 - 150,0 mg	
CARBAMAZEPINUM	p.o.	0,1 - 0,3	0,8 - 1,2	udr ovací dávka (ve 2 - 4 dávkách)
CARBENICILLINUM NATRICUM	p.o.	0,4 - 0,8	1,6 - 3,2	
	i.v.	5,0	4,0 - 30,0	
	i.m.	1,0 - 2,0	4,0 - 8,0	infekce močového ústrojí
CARBIDOPUM	p.o.	0,025 - 0,030	0,075 - 0,2	Podává se s levodopou v poměru: 1 : 4 - 1 : 10.
CARBIMAZOLUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,01 - 0,03	
CARBO ACTIVATUS	p.o.	0,5 - 1,5	2,0 - 6,0	U p.o. otrav jsou jednotlivé dávky 5 - 10 g, lze je opakovat.
CARBOCISTEINUM	p.o.	0,75	2,25	
CARBOPLATINUM	i.v. inf.	0,3 - 0,4/m^2		ka dé 4 týdny
CARVI ETHEROLEUM	p.o.	0,12	0,28	
CARVI FRUCTUS	p.o.	1,5	6,0	
CARYOPHYLLI ETHEROLEUM				1 - 5 % v přípravcích
CEFACLORUM	p.o.	0,25 - 0,5	0,75 - 4,0	
CEFADROXILUM	p.o.	0,5 - 1,0	1,0 - 2,0	
CEFALEXINUM MONOHYDRICUM	p.o.	0,25 - 1,0	1,0 - 4,0	
CEFALOTINUM NATRICUM	i.m., i.v.	1,0 - 2,0	4,0 - 12,0	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
CEFAZOLINUM NATRICUM	i.m., i.v.	0,25 - 1,5	0,75 - 6,0	
CEFOTAXIMUM NATRICUM	i.m., i.v.	1,0 - 2,0	2,0 - 12,0	
CEFOXITINUM NATRICUM	i.m., i.v.	1,0 - 3,0	3,0 - 12,0	
CEFRADINUM	p.o.	0,25 - 0,5	1,0 - 2,0	
	i.m., i.v.	0,5 - 1,0	2,0 - 4,0	
CEFTRIAXONUM NATRICUM	i.m., i.v.	0,5 - 2,0	1,0 - 4,0	
CEFUROXIMUM NATRICUM	p.o.	0,25 - 0,5	0,5 - 1,0	
	i.m., i.v.	0,75 - 1,5	2,25 - 6,0	
CENTAURII HERBA	p.o.	1,0	6,0	
CETIRIZINI DIHYDROCHLORIDUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,005 - 0,01	
CETRIMIDUM	ext.	0,5 - 1,0% roztok		
		0,5% krém		
		1 - 3% šampon		
CHAMOMILLAE ROMANAE FLOS	p.o.	1,5	6,0	
	loc.	12,0		
CHLORALI HYDRAS	p.o.	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0	p.rect. 1,0; max. p.rect. 2,0 - 6,0
CHLORAMBUCILUM	p.o.	0,1 - 0,2 mg/kg	0,1 - 0,2 mg/kg	
CHLORAMPHENICOLI NATRII SUCCINAS	p.o., i.v.	0,0125 - 0,025/kg	0,05 - 0,1/kg	
	loc.	0,5% oční kapky		první 2 dny ka dou hodinu 1 kapka do spojivkového vaku, dále 5x denně 1 kapka; celkem 1 - 2 týdny
		1,0% oční mast		Aplikuje se po 2 - 3 h po dobu nejméně 1 týdne.
CHLORDIAZEPOXIDUM	p.o.	0,005 - 0,025	0,015 - 0,1	
	i.m., i.v.	0,05 - 0,1	0,3 - 0,6	
CHLORHEXIDINI DIGLUCONATIS SOLUTIO	loc.	0,5% lihový roztok		
		0,05 - 0,5% vodný roztok		
		1% krém		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
CHLOROQUINI DIPHOSPHAS	p.o.	0,25 - 0,5	0,25 - 1,5	
	i.m.	0,25	0,25 - 0,75	
	i.v.		0,025/kg v několika infuzích během 30 - 32 h	
CHLOROTHIAZIDUM	p.o.	0,25 - 1,0	0,5 - 1,0	
	i.v.	0,25 - 2,0		
CHLORPHENAMINI HYDROGENOMALEAS	p.o.	0,004	0,016 - 0,024	
	p.o.	0,008 - 0,012	0,016 - 0,024	ve formě s řízeným uvolňováním
	i.m., s.c., i.v.	0,01 - 0,02	max. 0,04	
CHLORPROMAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,1	0,075	
	p.o.	0,01 - 0,025	0,04 - 0,15	antiemetikum
	i.m., i.v.	0,025 - 0,05	0,05 - 0,15	
	p.rect.	0,1	0,4	
CHLORPROPAMIDUM	p.o.	0,125 - 0,25	0,125 - 0,5	
CHLORPROTHIXENI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,075 - 0,6	
	i.m.	0,025 - 0,05	0,075 - 0,2	
CHLORTALIDONUM	p.o.	0,015 - 0,12	0,015 - 0,12	
CHLORTETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,25 - 0,5	1,0 - 2,0	
	intraocul.	1% oční mast		
	ext.	3% krém, mast		
CICLOSPORINUM	p.o.	0,014 - 0,018/kg		před transplantací 4 - 12 h
			0,014 - 0,018/kg	po transplantaci, po dobu 1 - 2 týdnů
			0,006 - 0,008/kg	udr ovací dávka
	i.v.		0,003 - 0,005/kg	po dobu 2 týdnů - dále individuální úprava

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
CIMETIDINUM	p.o.	0,2 - 0,4	1,0 - 1,6	nasogastr.
	i.v.	0,2	2,4	bolus
	inf.	0,4		dále v infuzi (lze opakovat po 4 - 6 h)
CINCHOCAINI HYDROCHLORIDUM	loc.	0,5% - 1,0% lékové formy		
CINCHONAE CORTEX	p.o.	0,5	1,0 - 3,0	
CINNAMOMI CORTEX	p.o.	2,0	4,0	
CINNARIZINUM	p.o.	0,025 - 0,075	0,05 - 0,225	
CIPROFLOXACINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,25 - 0,75	0,5 - 1,5	
	i.v.	0,1 - 0,4	0,2 - 0,8	
CISAPRIDUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,015 - 0,06	15 - 30 min před jídlem
CISPLATINUM	i.v.		0,05 - 0,12/m^2 jednou denně nebo rozděleně do 5 následujících dnů	ne častěji ne ka dé 3 - 4 týdny
CITRI ETHEROLEUM	p.o.	40 mg	214 mg	
CLINDAMYCINI DIHYDROGENOPHOSPHAS	p.o.	0,15 - 0,3	0,6 - 1,2	
CLINDAMYCINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,15 - 0,3	0,6 - 1,2	tě ká infekce, d.sing. 0,45, d. pro die 1,8
	i.m., i.v. inf.		0,6 - 2,7	v dílčích dávkách (max. 1,2 g/h); i.m. max. 600 mg v injekci
			a 4,8	tě ká infekce
	ext.	1% gel, roztok		
CLOBETASONI BUTYRAS	ext.	0,05% krém, mast		
CLOFIBRATUM	p.o.		0,02 - 0,03/kg (obvykle 1,5 - 2)	
CLOMIFENI DIHYDROGENOCITRAS	p.o.	0,05 - 0,1	0,05 - 0,1	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
CLOMIPRAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,25	0,25	
			0,05 - 0,15	udr ovací dávky
	i.m.		0,025 - 0,15	
	i.v.	0,05 - 0,075 během 1,5 - 3 h		
CLONAZEPAMUM	p.o.	do 0,001		úvodní dávka
			0,004 - 0,008 (max. 0,02)	udr ovací dávka
	i.v.		0,001 (max. 0,013)	
CLONIDINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05 - 0,1 mg	0,15 - 0,3 mg	úvodní dávka; Zvyšuje se podle odpovědi po 2 -3 dny.
			0,3 - 1,2 mg (ev. a 1,8 mg)	udr ovací dávka
	transderm.		0,1 - 0,3 mg týdně	
	i.v.	0,15 - 0,3 mg	0,75 mg	
	p.o.	0,05 - 0,1 mg po 1 h		tě ká hypertenze - úvodní dávka a do sní ení TK nebo celkové dávky 500 - 800 mg
	p.o.	0,05 mg (ev. a 0,075 mg)	0,1 mg (ev. a 0,15 mg)	migréna
CLOROXINUM	p.o.	0,25	0,75	nepodávat déle ne týden
CLOTRIMAZOLUM	ext.	1% krém, roztok, zásyp		aplikovat 2 - 3x denně 2 - 4 týdny
	vagin.		0,1	6 - 7 dní
			0,2	3 dny
		0,5		v 1 dávce
CLOXACILLINUM NATRICUM	p.o.	0,5	2,0	
	i.m., i.v.	0,25 - 1,0	1,0 - 6,0	
COCAINI HYDROCHLORIDUM	ext.	0,05 v max. 10% roztoku	0,1	max. k aplikaci na sliznici 1 - 1,5 mg/kg
		25% pasta		
CODEINUM	p.o., i.m.	0,03 - 0,06	0,18 - 0,36	
CODEINI DIHYDROGENOPHOSPHAS SESQUIHYDRICUS	p.o.	0,015 - 0,03	0,03 - 0,09	d.max.s. 0,1; d. max.p.d. 0,3

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
COFFEINUM	p.o.	0,05 - 0,25	0,2 - 0,5	d.max.s. 0,5; d. max.p.d. 1,5
COLCHICINUM	p.o.	0,001		úvodní dávka
		0,5 mg		pokračovací dávka ve 2 - 3h intervalech
		nepřekračovat dávku 10 mg	max. 0,01	akutní ataka dny
		0,5 mg		profylaxe atak dny
	i.v.		0,001	profylaxe atak dny
		0,002, dále 0,5 mg po 6 h	max. 0,004	akutní ataka dny
COLECALCIFEROLUM	p.o.		400 m.j. (= 0,01 mg)	prevence
			do 0,001 (40 tis. m.j.)	malabsorpce
			do 0,005 (200 tis. m.j.)	hypokalcemie při hypoparathyreoidismu
COLISTIMETHATUM NATRICUM	p.o.	1,5 - 3 mil. m.j.	4,5 - 9 mil. m.j.	
	i.m., i.v. inf.		6 mil. m.j. (asi 0,3 g)	v dílčích dávkách
COLISTINI SULFAS	p.o.	25 - 50 tis. m.j./kg	100 - 150 tis. m.j./kg	asi 75 - 150 mg 3x denně
	i.m., i.v.	25 - 50 tis. m.j./kg	50 - 100 tis. m.j./kg	asi 300 mg denně
	loc.			často v kombinaci s bacitracinem, neomycinem či glukokortikoidy
CORIANDRI ETHEROLEUM	p.o.	0,015	0,015	
CORTISONI ACETAS	p.o., i.m.		0,025 - 0,3	Dávkování je přísně individuální max. 0,15 - 0,3 (p.o., oční kapky).
CRATAEGI FOLIUM CUM FLORE	p.o.	2,0	6,0	
CUPRI SULFAS PENTAHYDRICUS	p.o.		0,5 - 1,5 mg	
CYANOCOBALAMINUM	i.m.		0,3 - 1,0 mg	
CYCLIZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05	0,200	
CYCLOPHOSPHAMIDUM	i.v.		0,02 - 0,04/kg	ka dých 10 - 20 dnů
			nebo 0,01 - 0,015/kg	ka dých 2 - 5 dnů
	p.o.		0,05 - 0,2	udr ovací terapie

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
CYPROHEPTADINI HYDROCHLORIDUM	p.o.		0,004 - 0,032	Dávkování je individuální.
CYPROTERONI ACETAS	p.o.	0,025 - 0,1	0,05 - 0,3	sexuální deviace u mu ů
		0,1	0,1 - 0,3	karcinom prostaty
		0,05	0,05	pubertas praecox
	i.m.		0,3 - 0,6 1x/14 dní	sexuální deviace
			0,3 1x/14 dní	karcinom prostaty
CYTARABINUM	i.v.		0,1/m^2 1 - 2x/den	po dobu 5 dnů
			2,0 - 4,0/m^2	akutní leukemie (2 - 3 dny)
DACARBAZINUM	i.v.		0,2 - 0,25/m^2	po dobu 5 dnů (mo né opakovat po 3 - 4 týdnech)
DAPSONUM	p.o.	0,05 - 0,2	0,05 - 0,2	
DAUNORUBICINI HYDROCHLORIDUM	i.v.		0,04 - 0,06/m^2	akutní nelymfoblastová leukemie dospělých (1. - 3. den 1. kúry, v dalších kúrách za 3 - 4 týdny pouze 1. a 2. den)
DEFEROXAMINI MESILAS	p.o.	5,0 - 10,0		akutní otrava elezem - úvodní dávka
	i.v. (s.c.)	1,0 - 2,0 po 3 - 12 h		pokračování
	i.m.		0,5 - 1,0	chronická otrava elezem
	inf.	1,5 - 4,0 během 12 h		
DEMECLOCYCLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.		0,6 (ev. a 0,9)	infekce (ve 2 - 4 dílčích dávkách)
			0,9 - 1,2	úvodní dávka (chronická hyponatremie)
			0,6 - 0,9	udr ovací dávka (chronická hyponatremie)
DESIPRAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,3	0,1 - 0,3	
	i.m.	0,025	0,05 - 0,1	
DESLANOSIDUM	i.v., i.m.	0,002		rychlá digitalizace; d.max.s. 0,8 mg, d.max.p.d. 1,6 mg

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
DESMOPRESSINUM	i.v., i.m.	1,0 - 2,0 mg	2,0 - 4,0 mg	diabetes insipidus
	inf.	0,3 mg/kg		preoperačně - u pacientů s hemofilií A
	intranas.	0,01% roztoky (kapky, nosní sprej): 5,0 - 20,0 mg	10,0 - 40,0 mg	do ka dého nosního průduchu
DESOXYCORTONI ACETAS	s.c. implantát	0,125		na 8 - 12 měsíců
DEXAMETHASONUM	p.o.		0,5 - 9,0 mg	Dávkování je přísně individuální.
	i.v.		2 - 6 mg/kg	denní dávku lze podat p.o. ve 2 - 4 dílčích dávkách
	loc.	0,1% lékové formy		
	inhal.	0,25 - 0,3 mg (aerosol)	0,75 - 2,0 mg	
DEXPANTHENOLUM	i.m., i.v. inf.		0,25 - 0,5	
	ext.	2% roztok, mast, krém		
DEXTROMETHORPHANI HYDROBROMIDUM	p.o.	0,015 - 0,03	0,06 - 0,18	
DEXTROMORAMIDI HYDROGEN TARTRAS	p.o.	0,005 (ev. a 0,02)		
	p.o., i.m., s.c.	0,005 (ev. a 0,015)		d.max.p.d. 0,12
	p.rect.	0,01		
DEXTROPROPOXYPHENI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,03 - 0,06	0,09 - 0,24	
DIAZEPAMUM	p.o.	0,002 - 0,01	0,004 - 0,04	Dávkování je individuální.
	i.v., i.m.	0,002 - 0,02		
DIAZOXIDUM	i.v.	0,001 - 0,003/kg		opakovaně v 5 - 15min intervalech
DICLOFENACUM NATRICUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,05 - 0,15	
	i.m.	0,075	0,075 - 0,15	
	loc.	1% lékové formy		
DICLOXACILLINUM NATRICUM	p.o.	0,125 - 0,25	0,5 - 1,0	
DIENESTROLUM	ext.	0,01% krém		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
DIETHYLCARBAMAZINI DIHYDROGENOCITRAS	p.o.	0,002/kg	0,006/kg	
DIETHYLSTILBESTROLUM	p.o.	2,5 - 3,0 mg	7,5 - 20,0 mg	karcinom prsu
		0,5 - 1,0 mg	1,0 - 3,0 mg	karcinom prostaty
	i.m.		15,0 mg	
	loc. vagin.		0,05 mg	eventuálně obden nebo 2x týdně 1 - 2 týdny
DIFLUNISALUM	p.o.	0,25 - 1,0	0,5 - 1,5	
DIGITOXINUM	p.o.	0,05 - 0,3 mg	0,05 - 0,3 mg	udr ovací dávky (Dávkování je přísně individuální.) d.max.s. 0,8 mg, d.max.p.d. 0,8 mg
		0,2 - 0,6 mg	0,4 - 1,2 mg	saturační dávky
DIGOXINUM	p.o.	0,005 mg/kg	0,005 mg/kg	udr ovací dávky (Dávkování je přísně individuální.) d.max.s. 1 mg, d.max.p.d. 2 mg
		0,125 - 0,75 mg	0,125 - 1,125 mg	saturační dávky
	i.v.	0,083 - 0,5 mg	0,083 - 0,75 mg	pro rychlou digitalizaci
DIHYDROERGOTAMINI MESILAS	p.o.	0,32 - 1,6 mg	0,96 - 4,8 mg	d.max.s. 4 mg, d.max.p.d. 10 mg
	i.m.	0,001	max. 0,003	v 1h intervalech
	i.v.	0,002		
DILTIAZEMI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,06 - 0,24	0,12 - 0,36	
DIMENHYDRINATUM	p.o., i.m., i.v.	0,05 - 0,1	0,4	
DIMERCAPROLUM	i.m.	0,004/kg		1. a 2. den: 6x denně 3. den: 4x denně 4. a další den: 2x denně Dávkování je individuální, závisí na typu kovu a stavu nemocného.
DIPHENHYDRAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,075 - 0,2	
	i.v., i.m.	0,01 - 0,1	0,4	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
DIPHENOXYLATI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,005	0,005 - 0,02	
DIPROPHYLLINUM	p.o.	0,015/kg po 6 h	max. 0,06/kg	
	i.m.	0,5		úvodní dávka
		0,25 - 0,5		udr ovací dávka (po 6 h)
DISOPYRAMIDUM	p.o.	0,15 - 0,3	0,45 - 0,6	Dávkování je individuální.
DISULFIRAMUM	p.o.	0,4 - 1,2 v jedné denní dávce	0,4 - 1,2	první 2 - 3 dny (v 1 dávce)
			0,2 - 0,4	udr ovací dávky
			0,4 2x/týden	po několika měsících
DITHRANOLUM	ext.	0,1 - 1% mast (krátkodobě a 5%)		
DOMPERIDONUM	p.o.	0,01 - 0,02	0,3 - 0,12	
	p.rect.	0,03 - 0,06	0,18 - 0,36	
DOPAMINI HYDROCHLORIDUM	i.v. inf.	0,002 - 0,005 mg/kg/min		úvodní rychlost
		0,02 - 0,05 mg/kg/min		pokračování
DOSULEPINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,01 - 0,15	0,025 - 0,45	
DOXEPINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,3	
DOXORUBICINI HYDROCHLORIDUM	i.v.		0,06 - 0,075/m^2 po 3 týdny nebo 0,02/m^2 týdně	
DOXYCYCLINUM	p.o., i.v.	0,05 - 0,1	0,1 - 0,2	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
DROPERIDOLUM	p.o.	0,005 - 0,02		psychóza (podle potřeby po 4 - 8 h)
	i.m.	0,01		psychóza (podle potřeby po 4 - 6 h)
	i.v.	0,005 - 0,015		psychóza (podle potřeby po 4 - 6 h)
	i.v.	0,015 - 0,02		neuroleptanalgezie, úvod při celkové anestezii
	i.v.	0,00125 - 0,0025		udr ovací dávka
	i.m.	0,0025 - 0,01		premedikace
	i.m., i.v.	0,0025 - 0,005		regionální anestezie
	i.m., i.v.	0,005		prevence pooperačního zvracení
	i.m., i.v.	0,001 - 0,01		při chemoterapii (úvodní dávka)
	i.m., i.v.		0,001 - 0,005	při chemoterapii (udr ovací dávka) - podle potřeby po 1 - 6 h
	inf.	0,001 - 0,003/h		při chemoterapii (udr ovací dávka)
ECONAZOLI NITRAS	loc.	1% lékové formy		
	vagin.supp.	0,05 - 0,15		
EMETINI HYDROCHLORIDUM	i.m., s.c.	0,02 - 0,03	0,04 - 0,06	
ENOXAPARINUM NATRICUM	s.c.	0,02 (2 tis. m.j.)	0,02 (2 tis. m.j.)	profylaxe (7 - 10 dní)
		0,04 (4 tis. m.j.)	0,04 (4 tis. m.j.)	profylaxe (7 - 10 dní) - rizikoví nemocní
		0,001 (1 tis. m.j.)/kg	0,001 (1 tis. m.j.)/kg	při hemodialýze
EPHEDRINUM	p.o.	0,0125 - 0,025	0,0375 - 0,075	max. 0,1 - 0,3 (p.o., nosní přípravky)
	i.m., s.c.	0,025 - 0,05		
EPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS	s.c. (i.m.)	0,2 - 1,0 mg	1,0 - 2,0 mg	vazokonstrikční přísada u lokálních anestetik v koncentraci 0,01 - 0,05 mg/ml
EQUISETI HERBA	p.o.	2,0	6,0	lokálně 10,0

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
ERGOCALCIFEROLUM	p.o.		400 m.j. (tj. 0,01 mg)	prevence osteomalacie
			3 - 5 tis. m.j.	nedostatek vitaminu D
			400 m.j.	k udr ení hladiny vitaminu D
	i.m.		300 tis. m.j.	lze zopakovat za 14 dnů
			300 tis. m.j./měsíc	udr ovací dávka
ERGOMETRINI HYDROGENOMALEAS	i.m., s.c., i.v.	0,5 mg		
	p.o.	0,2 - 0,4 mg	0,6 - 1,0 mg	d.max.s. 1,0 mg, d.max.p.d. 2,0 mg
ERGOTAMINI TARTRAS	p.o.	0,002 dále 0,001 po 0,5 h	max. 0,006	na začátku ataky migrény; d.max.s. 2,0 mg
	p.rect. (supp.)	0,002		na začátku ataky migrény (lze 1x za 1 h)
ERYTHROMYCINUM	p.o., i.v.	0,25 - 1,0	1,0 - 4,0	
	loc.	0,5 - 4% lékové formy		
ESTRADIOLI BENZOAS	p.o.	0,5 - 2,0 mg	0,5 - 3,0 mg	
		0,01	0,03	paliativní léčba nádorů prsu
	loc. (TDD)		0,05 - 0,1 mg	2x za týden
	loc. (vagin. krém)		0,2 - 0,4 mg (0,01 %)	1 - 2 týdny
	loc. (vagin. tablety)		0,025	2 týdny denně, dále 2x týdně
	i.m.	0,01		7. den cyklu,
		0,01		17. den cyklu (s progesteronem - léčba hypogonadismu)
ESTRONUM	p.o., i.m.		0,7 - 2,8 mg	
ETHAMBUTOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,015 - 0,025/kg	0,015 - 0,025/kg	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
ETHINYLESTRADIOLUM	p.o.	0,02 - 0,05 mg	0,02 - 0,05 mg	hormonální antikoncepce
		0,05	0,15 po 14 dní	substituční léčba (opakovat po 4 týdnech)
		0,01 - 0,05 mg	0,01 - 0,15 mg	menopauza
		0,001 - 0,003	0,001 - 0,003	rakovina prsu u en po menopauze
		0,15 - 2,0 mg		udr ovací dávky - paliativní léčba rakoviny prostaty. Současně se doporučuje podávat pyridoxin.
ETHOSUXIMIDUM	p.o.	0,5	0,5 - 1,5	
ETHYLIS BISCOUMACETAS	p.o.	0,2 - 0,4	0,6 - 1,2	1. den
		0,1 - 0,2	0,3 - 0,6	2. den
		0,1 - 0,15	0,3 - 0,45	další dny
ETHYLMORPHINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,03 - 0,09	0,09 - 0,27	d.max.s. 0,1, d.max.p.d. 0,3
ETOFYLLINUM	p.o.	0,1	0,3 - 0,8	
	i.v., i.m.		0,16 - 0,48	
ETOPOSIDUM	i.v. inf.		50 - 120 mg/m^2 tělesného povrchu během 30 - 60 min po dobu 5 dní	
	p.o.		0,1 - 0,24/m^2 tělesného povrchu během 30 - 60 min po dobu 5 dní	
EUCALYPTI ETHEROLEUM	p.o.	0,15	0,3 - 0,5	
EUGENOLUM	p.o., loc.	0,1	0,2 - 0,35	
FAMOTIDINUM	p.o.	0,02 - 0,04	0,02 - 0,08	
	i.v.	0,02	0,04	
FARFARAE FOLIUM	p.o.	1,5	4,5 - 6,0	
FELODIPINUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,005 - 0,02	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
FENOTEROLI HYDROBROMIDUM	inhal.	0,1 - 0,2 mg	0,3 - 0,9 mg (max. 0,4 mg po 6 h nebo 1,6 mg/den)	
	nebul.	0,5 - 1,25 mg	2,0 - 5,0 mg	
FENTANYLI DIHYDROGENOCITRAS	i.m., i.v.	0,05 - 0,1 mg		premedikace, d.max.p.d. 0,5 mg
	i.v.	0,1 mg (ev. a 0,05 mg/kg)		analgezie
		0,05 - 0,2 mg		spontánní dýchání
		0,3 - 3,5 mg (ev. a 0,05 mg/kg)		řízené dýchání (úvodní dávka)
		0,1 - 0,2 mg		pokračování
FERROSI FUMARAS	p.o.	0,2, tj. 0,065 eleza	0,6, tj. 0,195 eleza	
FERROSI GLUCONAS	p.o.	0,6, tj. 0,07 eleza	1,2, tj. 0,14 eleza	
FLUCLOXACILLINUM NATRICUM	p.o., i.m.	0,25	1,0	
	i.v. inf.	1,0 - 4,0		
	intraartic.		0,25 - 0,5	
	intrapleur.		0,25	
FLUCYTOSINUM	p.o.	0,05/kg	0,2/kg	
	i.v.	0,04/kg	0,15/kg	
FLUDROCORTISONI ACETAS	p.o.	0,05 - 0,2 mg	0,05 - 0,2 mg	
FLUNITRAZEPAMUM	p.o.	0,5 - 2,0 mg		
	i.m.	0,001 - 0,004		
	i.v.	0,001 - 0,004 během 0,5 - 1 min		úvod do celkové anestezie
	inf.	0,04 mg/kg/h		pokračování
FLUOCINOLONI ACETONIDUM	loc.	0,025 - 0,2% krémy		2 - 4x aplikovat
		0,025% masti		
		0,01% roztoky		
FLUORESCEINUM NATRICUM	intraocul.	1 - 2% roztok		v oční diagnostice
	i.v.	0,5		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
FLUOROURACILUM	i.v.		0,5/m^2 denně v 5denní kúře	Existují i jiná dávkovací schémata.
	loc.	1 - 5% krémy		2x denně po dobu několika týdnů
		2 - 5% roztoky		
FLUPHENAZINI DIHYDROCHLORIDUM	p.o.		0,0025 - 0,01 (max. 0,02)	ve 2 - 3 dílčích dávkách
			0,001 - 0,005	obvyklé udr ovací dávky
	i.m.		0,0125 po 2 týdny	úvodní dávka
			0,025 po 2 týdny	pokračovací dávka
			0,0125 - 0,1 po 1 - 6 týdnů	udr ovací dávka
FLURAZEPAMI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,015 - 0,03		na noc
FOENICULI AMARI FRUCTUS	p.o.	1,5	5,0 - 7,0	
FOENICULI DULCIS FRUCTUS	p.o.	1,5	5,0 - 7,0	
FOENICULI ETHEROLEUM	p.o.	0,1	0,5	
FRAMYCETINI SULFAS	p.o.	1,0	4,0	2 - 3 dny preoperativně
FRANGULAE CORTEX	p.o.	1,0	2,0	
FUROSEMIDUM	p.o.	0,04 - 0,25	0,04 - 1,0	
	i.v.	0,02 - 0,08	0,12 - 0,48	
GALLA	p.o.	1,2	2,4	
GALLAMINI TRIETHIODIDUM	i.v.	0,001/kg		
GENTAMICINI SULFAS	i.m., i.v.	0,06 - 0,08	0,18 - 0,24	
	loc.	0,1% masti, krémy		3 - 4x denně
GENTIANAE RADIX	p.o.	1,0	3,0	
GERANII ETHEROLEUM	loc.	0,2% masti, krémy		
GLIBENCLAMIDUM	p.o.	0,00125 - 0,02	0,00125 - 0,02	výrazně individuální
GLIPIZIDUM	p.o.	0,005 - 0,015	0,005 - 0,04	výrazně individuální

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
GLUCAGONUM	s.c., i.m., i.v.	0,001 - 0,002	0,001 - 0,003	Dávky 2 mg bývají častěji spojeny s nauzeou a zvracením ne dávky ni ší.
GLUTETHIMIDUM	p.o.	0,25 - 0,5	0,25 - 0,5	
GLYCEROLUM	p.o.	1 - 1,5/kg v 50 - 75% roztoku		
	p.rect.	3,0		
GONADORELINUM	i.v., s.c.	100 mg		diagnostika
		5 - 20 mg po 90 min		terapie
		5 - 20 mg/min ka dých 90 min po dobu 6 měsíců		hypogonadotropní hypogonadismus (Podává se řízenou pumpou.)
GONADOTROPINUM CHORIONICUM	i.m.	do 10 tis. m.j.		eny (infertilita)
	i.m.		500 - 4 000 m.j. 3x týdně	mu i (kryptorchismus), 6 - 10 týdnů
	i.m.		4 000 m.j. 3x týdně	3 týdny
	i.m.		5 000 m.j.	obden (celkem 4 injekce)
	i.m.		500 - 1 000 m.j.	6 týdnů (15 injekcí)
	i.m.		500 m.j. 3x týdně	4 - 6 týdnů
	i.m.		1 000 m.j. 3x týdně	1 měsíc později (při nedostatečné odpovědi)
	i.m.		2 000 m.j. 2x týdně	centrální hypogonadismus
	i.m.		500 - 1 000 m.j. 3x týdně	3 týdny, poté 2x týdně 3 týdny
	i.m.		4 000 m.j. 3x týdně	6 - 9 měsíců
	i.m.		poté 2 000 m.j. 3x týdně	3 měsíce
	i.m.		500 m.j. 2x týdně	opo děná puberta u mu ů, 4 - 6 týdnů
	i.m.		ev. a 1500 m.j. 2x týdně	6 měsíců
	i.m.		500 m.j. 2 - 3x týdně	oligospermie - 16 týdnů
GRISEOFULVINUM	p.o.	0,125 - 0,25	0,5 - 1,0	max. 0,5 - 2,0
GUAIFENESINUM	p.o.	0,2 - 0,4	0,6 - 2,0	max. 0,5 - 2,0
	i.v.	1,0 - 2,0 v G5		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
GUANETHIDINI SULFAS	p.o.	0,01 - 0,05	0,01 - 0,05	.
GUAR GALACTOMANNANUM	p.o.	5,0	15,0	
GUMMIRESINA MYRRHA	loc.	20% tinktura		
HALOPERIDOLUM	p.o.	0,5 - 5,0 mg	0,001 - 0,1	psychóza
	i.m.	0,002 - 0,005	0,008 - 0,04	
	i.m. depot		0,05 - 0,150 (ev. a 0,3)	ka dé 4 týdny
HAMAMELIDIS FOLIUM	p.o.	0,1 - 1,0	5,0	
HARPAGOPHYTI RADIX	p.o.	1,5	4,5	
HEPARINA MASSAE MOLECULARIS MINORIS	s.c.	100 - 450 m.j./kg	100 - 450 m.j./kg	
HEPARINUM CALCICUM	s.c.	5 tis. m.j.	10 - 15 tis. m.j.	výrazně individuální
	i.v.	10 tis. m.j.	10 tis. m.j.	
	inf.	1 500 m.j./h		
HEXACHLOROPHENUM	loc.	3% emulze		2 - 3x denně
		0,4% sprej		
HISTAMINI DIHYDROCHLORIDUM	s.c.	1 roztok		
	i.v. inf.	0,01 - 0,024 mg/kg		
HOMATROPINI HYDROBROMIDUM	loc.	1 - 4% oční kapky		
HYALURONIDASUM	s.c., i.m.	135 - 270 m.j.	135 - 270 m.j.	m.j. (turbidimetrická jednotka)
HYDRALAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,01 - 0,05	0,04 - 0,2	
	i.v., i.m.			
HYDROCHLOROTHIAZIDUM	p.o.	0,0125 - 0,1	0,0125 - 0,2	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
HYDROCORTISONUM	p.o.	0,02 ráno, 0,01 pozdě odpoledne	0,030	substituční terapie, max. 0,1 - 0,2 (acetat)
	i.v.	0,1 - 0,5	0,3 - 2,0	naléhavé situace
	loc. inj.	0,1 - 0,2		
	intraartic.	0,005 - 0,05		
	loc.	0,1 - 2,5% krémy, masti, lotia		
HYDROXYZINI DIHYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,2 - 0,4	úzkost
		0,025	0,075 - 0,1	pruritus
		0,05 - 0,1		předoperační sedace
	i.m.	0,05 - 0,1		úzkost - dále po 4 - 6 hodinách podle potřeby
		0,025 - 0,1		ostatní diagnózy
HYMECROMONUM	p.o.	0,4	1,2	
HYOSCYAMI FOLIUM	p.o.	0,500		d.max.s. 1,0 g; d.max.p.d. 3,0
HYOSCYAMI PULVIS NORMATUS	p.o.	0,15 - 0,3 mg	0,6 - 1,2 mg	
HYOSCYAMINI SULFAS	subling.	0,125 - 0,25 mg	0,75 - 1,5 mg	
	p.o.	0,375 - 0,75 mg	0,75 - 1,5 mg	léková forma s řízeným uvolňováním
HYPERICI HERBA	p.o.	1,5	2,0 - 4,0	
IBUPROFENUM	p.o., p.rect. (supp.)	0,3 - 0,5	1,2 - 3,2	
	i.m.	0,4	0,8	
IDOXURIDINUM	loc.intraocul.	5% roztok		4x denně
		0,5% mast		5x denně
		1 roztok		po 1 h (v noci po 2 h)
IMIPRAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,3	0,075 - 0,3	
	i.m.	0,005 - 0,05	0,15 - 0,2	
INDAPAMIDUM	p.o.	0,00125 - 0,005	0,00125 - 0,005	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
INDOMETACINUM	p.o., p.rect.	0,025 - 0,07	0,05 - 0,2	
	loc.	1% gel		
	i.v.	0,05	0,05 - 0,12	
INSULINI BIPHASICI INIECTIO	s.c., i.m., i.v.	individuální dávkování	asi 0,5 - 1 m.j./kg	
INTERFERONI ALFA - 2 SOLUTIO CONCENTRATA 2a	s.c., i.m.		3 mil. m.j.	leukemie z vlasatých buněk (do zlepšení nebo 24 týdnů)
			3 mil. m.j. 3x/týden	dále: udr ovací dávky
			36 mil. m.j., poté stejná dávka 3x týdně	Kaposiho sarkom (4 - 10 týdnů)
			36 mil. m.j. 3x/týden	dále: udr ovací dávky
			9 mil. m.j. 3x/týden	chronická granulocytární leukemie (8 týdnů)
	i.m.		3 - 36 mil. m.j. 3x/týden	karcinom ledvin (10 - 12 týdnů)
2b	s.c.		2 mil. m.j./m^2 3x týdně	leukemie z vlasatých buněk
	s.c., i.m.		30 mil. m.j./m^2 3x týdně	Kaposiho sarkom
	s.c.		4 - 5 mil. m.j./m^2	chronická granulocytární leukemie (8 týdnů)
			3 mil. m.j./m^2 3x týdně	mnohočetný myelom v remisi
	inj. (do léze)		1 mil. m.j. obden (max.15 mil.m.j.)	kondylomata acuminata (3 týdny)
IODUM	loc.	6,5% tinktura		
		1% Lugolův roztok		
IOHEXOLUM	intrathec.	6 - 12,5 ml 51,8% roztoku (tj. 0,24 g jodu/ml)		diagnostikum (myelografie)
IOPAMIDOLUM	intrathec.	5 - 15 ml 40,8% roztoku (tj. 0,2 g jodu/ml)		
	i.v.	40 - 80 ml 31,2 - 35,5% roztoku (tj. 0,3 - 0,37 g jodu/ml)		diagnostikum (urografie)
	p.o.	31,2% roztok (0,3 g jodu/ml)		diagnostikum (GIT)
IPECACUANHAE PULVIS NORMATUS	p.o.	0,05	0,15	d.max.s. 2,0; d. max.p.d. 4,0
IPECACUANHAE RADIX	p.o.	0,05	0,15	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
IPRATROPII BROMIDUM	inhal.	20 - 40 mg (aerosol)	60 - 160 mg (aerosol)	
		0,2 mg (prášek)	1,2 mg (prášek)	
ISOCONAZOLUM	loc.	1 - 2% krém		
	vagin.	600 mg		globule
ISONIAZIDUM	p.o. cont.	0,3/kg	0,3/kg	K prevenci periferní neuropatie se k isoniazidu přidává pyridoxin.
	p.o.intermit.		0,015/kg/týden	
ISOPRENALINI SULFAS	inf.	0,5 - 10 mg/min		bradykardie (převodní blokáda) neodpovídající na atropin
	p.o.	0,03	0,09 - 0,84	
	subling.	0,01 - 0,02	0,03 - 0,06	
	s.c., i.m.	200 mg		
	i.v.	10 - 60 mg		
	intracard.	20 mg		
	inhal.	80 mg	80 - 240 mg (max. 640 mg)	
ISOSORBIDI DINITRAS DILUTUS	p.o.	0,005 - 0,03	0,04 - 0,12, ev. a 0,24	
		0,12		retardovaná forma
	i.v.	0,002 - 0,01/h		
	subling.	0,001 - 0,005 (sprej)		
	TTS		0,005 - 0,03	
ISOSORBIDI MONONITRAS DILUTUS	p.o.	0,02	0,04 - 0,12	
ISOTRETINOINUM	p.o.		0,1 - 1 mg/kg	
UNIPERI FRUCTUS	p.o.	0,5	2,0	max. 10,0
KALII CHLORIDUM	p.o.	0,5 - 1,0	2,0 - 4,0	dávkování podle diagnózy a stavu nemocného
KALII IODIDUM	p.o.	0,05 - 0,5	0,15 - 0,3	
KALII PERCHLORAS	p.o.	0,2	0,2 - 0,6	před podáním (^{99m}Tc)
KALII PERMANGANAS	ext.	0,01% roztok		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
KANAMYCINI MONOSULFAS	i.m.	0,25 - 0,5	1,5	redukce dávky při renálním selhávání
	i.v.	0,003 - 0,015/kg	0,015 - 0,03/kg	
KETAMINI HYDROCHLORIDUM	i.v.	0,001 - 0,0045/kg		Pro udr ení anestezie mohou být podány další dávky.
	i.m.	0,0065 - 0,013/kg		
KETOCONAZOLUM	p.o.	0,2	0,2	
	vagin.	0,4	0,4	5 dní
	loc.	2% krém, šampon		
KETOPROFENUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,1 - 0,2	
	p.rect.	0,1	0,1	
	i.m.	0,05 - 0,1	0,2	
	loc.	2,5% gel		
LABETALOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,1 - 0,8	0,2 - 2,4	
	i.v. inf.	0,001 - 0,004/min		do celkové dávky 0,2
	i.v. bolus	0,05		ev. opakovat po 15 min do celkové dávky 0,2
LACTULOSI SOLUTIO	p.o.	5,0 - 15,0	5,0 - 30,0	dávkování podle diagnózy a stavu nemocného; vyjádřeno jako laktulosa
LANATOSIDUM C	p.o.		0,0015 - 0,002	digitalizace - 3 - 5 dní (v dílčích dávkách); d.max.s. 1,0 mg, d.max.p.d. 2,0 mg
			0,25 - 1,5 mg	udr ovací dávka
LAVANDULAE ETHEROLEUM	p.o.	20,0 mg	80,0 mg	loc. 20 - 100 g/20 l vody
LEVAMISOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,0025/kg	0,0025/kg	
LEVISTICI RADIX	p.o.	2,0	4,0 - 8,0	
LEVODOPUM	p.o.	0,05 - 0,25	0,4 - 1,5	Dávkování je individuální.
LEVOMEPROMAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o	0,05 - 0,15	0,05 - 0,6	psychóza
		0,025 - 0,05	0,05 - 0,25	analgetikum
		0,0125 - 0,025	0,0125 - 0,075	antiemetikum
	i.m.	0,025 - 0,05	0,025 - 0,35	akutní psychóza

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
LEVONORGESTRELUM	p.o.	0,750 mg		postkoitální antikoncepce
		0,05 - 0,15 mg	0,05 - 0,15 mg	hormonální antikoncepce
LEVOTHYROXINUM NATRICUM	p.o.		50 - 200 mg, lze přidat 25-50 mg po 2-4 týdny	
			100-200 mg	obvyklá udr ovací dávka
	i.v., i.m.	200 - 500 mg		úvodní dávka
		100 - 300 mg	poté 100 - 200 mg/den	Podává se 2. den (nedojde-li ke zlepšení).
LICHEN ISLANDICUS	p.o.	1,5	4 - 6	
LIDOCAINUM	loc.- mast	0,25 jednorázově		povrchová anestezie
	loc.- 2% gel		max. 1,2	povrchová anestezie
	loc.- 2% roztok	0,1	max. 0,6	povrchová anestezie
	loc.- 4% roztok	0,04 - 0,3		bronchoskopie
	inj. 0,5 - 1% roztok	0,005 - 0,3		infiltrační anestezie
	inj. 1 - 1,5% roztok	0,03 - 0,3		periferní nervová blokáda
	inj.- 4% roztok	0,12 - 0,2		retrobulbární blokáda
			max. 0,5	zubní lékařství (spolu s adrenalinem)
			max. 0,2	zubní lékařství (bez adrenalinu)
	inj.- 1% roztok	0,05 - 0,5		blokáda sympatiku
	inj.- 1 - 2% roztok	0,25 - 0,3		epidurální anestezie
	inj. - 1,5-5% roztok	0,05 - 1,0		spinální anestezie
	i.v. - 0,5% roztok	0,05 - 0,3 (max. 0,004/kg)		i.v. svodná anestezie
	i.v.	0,001 - 0,0015/kg (0,025 - 0,05/min)		antiarytmikum
		max. 0,2 - 0,3/h		
	inf.	20 - 50 mg/kg		úvodní dávka
		0,001 - 0,004/min, max. 0,3/h		pokračování
	i.v.	0,1 jednorázově		resuscitace
	i.m.	0,003 - 0,005/kg (max. 0,3/h)		lze opakovat po 60 - 90 min

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
LIMONIS ETHEROLEUM	p.o.	40 mg	214 mg	
LINCOMYCINI HYDROCHLORIDUM MONOHYDRICUM	p.o.	0,5	1,5 - 2,0	alespoň 1 h před jídlem
	i.m.	0,6	0,6 - 1,2	
	i.v.	0,6	1,2 - 1,8	alespoň ve 100 ml rozpouštědla
LINDANUM	ext.	1% přípravky		
LINI SEMEN	p.o.	5,000	10,000	
	loc.	30 - 50 mg		
LIOTHYRONINUM NATRICUM	p.o.	0,005 - 0,02 mg	0,025 - 0,1 mg	dávkování individuální
	i.v.	0,005 - 0,05 mg		
LIQUIRITIAE RADIX	p.o.	1,5	5,0 - 15,0	
LISINOPRILUM DIHYDRICUM	p.o.	0,005 - 0,04	0,005 - 0,04	
LITHII CARBONAS	p.o.	0,2 - 0,6	0,4 - 1,2	profylaxe
			1,5 - 2,0	akutní ataka manie - 5 - 7 dní
LITHII CITRAS	p.o.	0,5 - 1,5	1,1 - 3,3	v dílčích dávkách nebo ve formě s řízeným uvolňováním
LOMUSTINUM	p.o.		0,13/m^2 jednou za 6 týdnů	úpravy dávkování podle krevního obrazu
LOPERAMIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,002 - 0,004	0,006 - 0,008, max. 0,016	
LORAZEPAMUM	p.o.	0,5 - 1 mg	0,001 - 0,004 (a 0,01)	úzkost
	p.o.	0,001 - 0,004 na noc	0,001 - 0,004 (a 0,01)	nespavost
	p.o.	0,002 - 0,004		premedikace
	i.m., i.v.	0,025 - 0,03 mg/kg	0,1 - 0,2	úzkost
		0,05 mg/kg		premedikace
	i.v.	0,004		status epilepticus
LYPRESSINI SOLUTIO INIECTABILIS	intranas.	2 - 5 m.j.	6 - 20 m.j.	
MAGNESII CHLORIDUM HEXAHYDRICUM	inj.		5 mmol Mg^2	dávkování podle diagnózy a stavu nemocného

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
MAGNESII HYDROXIDUM	p.o.		a 2,0	antacidum
			5,0	laxans
MAGNESII LACTAS DIHYDRICUS	p.o.	1,0	2,0 - 3,0	
MAGNESII OXIDUM LEVE	p.o.	0,5		antacidum
MAGNESII SUBCARBONAS LEVIS	p.o.		1,0 - 5,0	
MAGNESII SULFAS	i.v., i.m., s.c.	0,1 - 0,4 (a 4,0/h)	max. 30,0	při normální funkci ledvin
MAGNESII TRISILICAS	p.o.	2,0		
MANNITOLUM	i.v.	10 - 20% roztoky	200,0	
		1,0/kg v průběhu 20 min		edém mozku, lze opakovat po 4 -12 h
MARRUBII HERBA	p.o.	1,5	4,5	
MATRICARIAE FLOS	p.o.	1,5	7,5	loc. 3,0 g/100 ml vody
MEBENDAZOLUM	p.o.	0,1	0,1 - 0,2	Dávkovací schémata závisí na vyvolávajícím agens.
MEDOSULEPINI HYDROCHLORIDUM	i.v.inf.	0,025	0,05	
MEDROXYPROGESTERONI ACETAS	i.m.		0,05/týden	endometrióza
			nebo 0,1/2 týdny	po dobu 3 měsíců
			0,15 po 3 měsíce	dlouhodobá antikoncepce
			0,4 - 1,0 1x/týden	paliativní léčba rakoviny endometria
			0,4 1x/měsíc	po stabilizaci stavu
			0,5 1 - 2x/týden	karcinom prostaty
	p.o.		0,0025 - 0,01	dysfunkční krvácení (5 - 10 dní) - začátek mezi 16. - 21. dnem cyklu
		10,0 mg	30,0 mg	endometrióza
			0,2 - 0,6	karcinom endometria
			0,4 - 1,5	karcinom prsu
			0,1 - 0,5	rakovina prostaty
MEGLUMINUM	p.o.	2,0	10,0	
MENTHAE PIPERITAE ETHEROLEUM	p.o.	0,3	0,6	k inhalacím 3 - 4 kapky

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
MENTHAE PIPERITAE FOLIUM	p.o.	1,5	6,0	
MENTHAE PIPERITAE HERBA	p.o.	3,0	12,0	
MEPROBAMATUM	p.o.	0,4	1,2 - 2,4	
MEPYRAMINI HYDROGENOMALEAS	p.o.	0,1	0,3, max. 1,0	
MERCAPTOPURINUM	p.o.		0,0025 - 0,005/kg	Dávky jsou individuální, závisí i na kombinaci cytostatik.
MESTRANOLUM	p.o.	0,05 mg	0,1 - 1,5 mg	sekundární amenorea - 1. - 14. den cyklu
			dále 0,05 mg (společně s progestinem)	1 týden
METFORMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,5 - 0,85	1,0 - 3,0	
METHADONI HYDROCHLORIDUM	p.o., i.m., s.c.	0,0025 - 0,01	0,005 - 0,02	d.max.s. 0,02, d.max.p.d. 0,04
			0,015 - 0,02, ev. a 0,04	léčba závislosti morfinového typu - max. 3 týdny
METHAQUALONUM	p.o.	0,15 - 0,3		na noc
METHIONINUM	p.o.	0,05 - 0,075	0,15 - 0,225	2,5 g 4x po 4 h po otravě paracetamolem
METHOTREXATUM	p.o., i.m., i.v.		0,015 - 0,03/m^2 1 - 2x týdně	udr ovací léčba při remisi akutní lymfoblastické leukemie
	intrathec.		0,015/m^2 1x týdně	meningeální leukemie
	p.o., i.m., i.v.		0,015 - 0,03	solidní tumory - ve 3 - 5 kúrách (5 dní) po 1 týden (spolu s leukovorinem)
	p.o.		0,015 - 0,02 1x/týden	psoriáza
METHYLCELLULOSUM	p.o.		1,0 - 6,0	
	intraocul.	0,5 - 1% roztok		
METHYLDOPUM	p.o.	0,25 - 0,5	0,5 - 2,0	
METHYLIS SALICYLAS	ext.			mast, linimenta
METHYLPHENOBARBITALUM	p.o.		0,2 - 0,4 (ev. a 0,6)	
METHYLPREDNISOLONUM	p.o.		0,006 - 0,096	
	i.m.		0,04 - 0,06 1x po 1 - 4 týdny	depot
	intraartic.		max. 0,08	
	i.v. inf.	0,03/kg		léčba šokových stavů
	i.v.	0,02 - 0,04		status asthmaticus - úvodní dávka
	inf.	0,02 po 2 h		pokračování

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
METHYLROSANILINII CHLORIDUM	ext.	1,2 - 1,6% krém, 2% roztok		
	intraocul.	0,5 - 1% roztok		
METHYLTESTOSTERONUM	p.o.	0,010	0,01 - 0,05	u mu ů
			0,05 - 0,2	paliativní léčba rakoviny prsu u en
METOCLOPRAMIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,01 - 0,015	0,04 - 0,06	gastroezofageální reflux
	i.v., i.m.	0,01	0,04	diabetická gastroparéza
	inf.	0,001 - 0,002/kg		antiemetikum
METOPROLOLI TARTRAS	p.o.	0,05 - 0,1	0,1 - 0,45	Dávky závisí na indikaci.
METRIFONATUM	p.o.		0,0075 - 0,01/kg po 2 týdny	
METRONIDAZOLUM	p.o.	0,4 - 0,8	1,2 - 2,4	amoebiáza (5 - 10 dní)
	p.o.		2,0	girardiáza (3 dny)
	p.o.		2,0	trichomonóza (7dní)
		nebo 0,2 - 0,25	0,6 - 0,75	trichomonóza (7dní)
		nebo 0,4	0,8	trichomonóza (7dní)
	p.o.	0,2	0,6	nekrotizující ulcerózní gingivitida (3 dny)
	p.o.	0,8		anaerobní infekce (úvodní dávka)
	p.o.	0,4	1,2	anaerobní infekce (pokračování)
	p.rect.	1,0	3,0	po 8 h
	i.v.	0,5 (0,025/min)	1,5	po 8 h
	p.o.	0,4	1,2	prevence pooperační anaerobní infekce (po 8 h 24 h před operací)
	i.v.	0,5		prevence pooperační anaerobní infekce (před operací)
		0,5	1,5	dále po 8 h
	loc.	0,8% gel		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
MEXILETINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,4	0,1 - 0,8	saturační dávka
		0,05 - 0,2		pokračování
	i.v.	0,25		
	inf.	0,01/min (max. 0,5)		do vymizení arytmie
MIANSERINI HYDROCHLORIDUM	p.o.		0,03 - 0,04	úvodní dávka
			0,03 - 0,09	obvykle účinná dávka
MICONAZOLUM	i.v.	0,07 - 1,2	0,2 - 3,6	
	loc.	2% krém		
	vagin.	0,02 - 0,04		kapsle
	intrathec.	0,02		po 3 - 7 dní
	p.o.	0,125 - 0,25	0,5 - 1,0	
MIDAZOLAMUM	i.v.	0,0025 - 0,0075		v zubním lékařství
	i.v.	0,2 - 0,3 mg/kg		úvod do anestezie
	i.m.	0,005 (0,07 - 0,1 mg/kg)		premedikace
	p.o.	0,0075 - 0,015		insomnie
MILLEFOLII HERBA	p.o.	1,5	4,5	ke koupelím 100 g/20 l vody
MINOCYCLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,2	
	i.v.		0,4	
MINOXIDILUM	p.o.	0,005 - 0,04	a 0,1	
	loc.	1 ml (2% roztok)	2 ml	alopecie
MORPHINI HYDROCHLORIDUM	s.c., i.m., i.v.	0,002 - 0,02 po 4 h	0,01 - 0,04	d.max.s. 0,02, d.max.p.d. 0,06
	p.o.	0,01 - 0,02 po 4 h	0,02 - 0,04	
	p.rect.	0,015 - 0,03 po 4 h		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
NADROPARINUM CALCICUM	s.c.		3075 m.j.	profylaxe - 7 dní
			41 m.j./kg	rizikoví nemocní (12 h preoperačně, dále pooperačně 3 dny)
			poté 61,5 m.j/kg	celkem 10 dní
		100 m.j./kg	200 m.j./kg	léčba tromboembolismu - 10 dní (po 12 h)
NALOXONI HYDROCHLORIDUM	i.v., i.m., s.c.	0,4 - 2,0 mg	a 0,01	
NAPHAZOLINI HYDROCHLORIDUM	loc.	0,025 - 0,030% oční roztok		1 - 2 kapky do ka dého oka po 3 - 4 h
		0,05 - 0,1% oční roztok		2 - 10 kapek/den
NAPROXENUM	p.o.	0,25 - 0,75	0,5 - 1,0	
NATRII CALCII EDETAS	i.v. (i.m.)	0,02/kg	0,04/kg	
NATRII CHLORIDUM	p.o.		1,0 - 2,0 (a 12,0)	
	i.v.			podle diagnózy a stavu nemocného
NATRII CITRAS DIHYDRICUS	p.o.		15,0	v dílčích dávkách
NATRII FLUORIDUM	p.o.	0,02 - 0,045		
NATRII HYDROGENOCARBONAS		individuální výpočet dávky: deficit bází (mmol/l) x 0,3 x hmotnost (kg)		korekce metabolické acidózy
	p.o.		100 - 200 mmol	korekce středně tě ké acidózy
	i.v.		300 mmol	korekce akutní metabolické acidózy
	p.o.		1 - 5 g (60 mmol)	antacidum
NATRII NITROPRUSSIAS	i.v. inf.	0,5 - 1,5 mg/kg/min (a 8 mg/kg/min)		Rychlost infuze se upravuje.
NATRII PICOSULFAS	p.o.	0,0025 - 0,01		
NATRII SALICYLAS	p.o., i.v.	1,0 - 2,0	5,0 - 8,0 (a 17,0)	
			3,5 - 5,0	revmatoidní artritida
NATRII SULFAS	p.o.	7,5 - 15,0 v 300 ml vody		osmotické laxativum
	i.v. inf.	3,9% roztok		tě ká hyperkalcemie

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
NATRII THIOSULFAS	p.o.	5 % roztok - 2,0 - 4,0	2,0 - 8,0	součást terapie intoxikace kyanidy - výplach aludku
		25% roztok - 300 ml		ponechá se v aludku po výplachu
	i.v.	4,0		lze opakovat
NATRII VALPROAS	p.o.		0,6	úvodní dávka (v dílčích dávkách)
			0,2 po 3 dny	zvyšování dávky
			1,0 - 2,0 (ev. 2,5 g) (0,02 - 0,03/kg)	celková udr ovací dávka
	i.v., inf.	0,01/kg		v úvodních dávkách
			ev. a 2,5	
NEOMYCINI SULFAS	p.o.	1,0 - 2,0	4,0 - 12,0	jaterní encefalopatie, max. 1,0 - 6,0 (neomycinu)
	loc.	4,0 - 8,0		
NEOSTIGMINI BROMIDUM	p.o.	0,015 - 0,03	0,03 - 0,09	d.max.s. 0,015, d.max. p.d. 0,15
	i.m., i.v., s.c.	0,25 - 2,0 mg	0,005 - 0,02	
NICLOSAMIDUM	p.o.	2,0	2,0	ráno nalačno
NICOTINAMIDUM	p.o.	0,1	0,3 - 0,6	v dílčích dávkách
	s.c., i.m.	0,1	a 6,0	během 2 - 4 týdnů
NIFEDIPINUM	p.o.	0,01 - 0,04	0,1 - 0,18	nepodávat dlouhodobě
NITRAZEPAMUM	p.o.	0,0025 - 0,03	0,005 - 0,03	
NITROFURALUM	ext.	0,2% roztok		
NITROFURANTOINUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,2 - 0,3	
	loc.	0,1	0,2	
NITROGENII OXIDUM	inhal.	20%		úvodní saturace
		50%		udr ovací saturace (bez vzduchu, bez kyslíku)
		50%		udr ovací saturace (s kyslíkem)
NOREPINEPHRINI HYDROCHLORIDUM	i.v. inf.	0,002 - 0,004 mg/min		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
NORETHISTERONUM	p.o.		0,005 - 0,02	abnormální krvácení
			0,01 - 0,03	endometrióza
			0,5 - 1 mg	antikoncepce (v kombinaci)
			0,35 mg	antikoncepce (monoterapie)
			0,06	karcinom prsu
			0,015	premenstruační syndrom
NORGESTRELUM	p.o.		0,3 - 0,5 mg	
NORTRIPTYLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,01 - 0,02	0,02 - 0,04, max. 0,1	
NOSCAPINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05	0,15	
NYSTATINUM	p.o.	0,5 - 1 mil. m.j.	1,5 - 3 mil. m.j.	kandidóza dutiny ústní a střev
	loc.	mast (100 tis. m.j./1 g)		
	vagin.	mast nebo čípky (200 000 m.j.)		
OMEPRAZOLUM	p.o.	0,02 - 0,04	0,02 - 0,08 (ev. a 0,18)	
ONONIDIS RADIX	p.o.	2,0	12,0	
OPIUM CRUDUM	p.o.	0,050	0,2	d.max.s. 0,15, d.max.p.d. 0,5
ORCIPRENALINI SULFAS	p.o.	0,01 - 0,02	0,04 - 0,12	
	i.m., s.c., i.v.	0,5 mg	0,5 - 1,0 mg	
ORNIDAZOLUM	p.o.	0,5 - 1,5	1,0 - 1,5	Dávky závisí na vyvolávajícím agens.
	i.v.	0,5 - 1,0	1,0 - 1,5	
OUABAINUM	i.v.	0,1 - 0,2 mg		
	p.o.		a 0,024	
OXAZEPAMUM	p.o.	0,01 - 0,03	0,03 - 0,12	
OXPRENOLOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,02 - 0,24	0,04 - 0,48	
OXYMETAZOLINI HYDROCHLORIDUM	intranas.	0,05% roztok	2x denně 2 - 3 kapky	
OXYPHENBUTAZONUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,3 - 0,6	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
	i.m.	0,1 - 0,25	0,25 - 0,3	
OXYTOCINUM	i.v., i.m.	0,5 - 3 m.j.	1 - 5 m.j.	
	i.v. inf.	1 - 3 m.j. ve 300 - 500 ml G5		
PANCURONII BROMIDUM	i.v.	0,02 - 0,1 mg/kg		úvodní dávka
		0,01 - 0,02 mg/kg		pokračovací dávka
PAPAVERINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,12 - 0,6	
	i.v., i.m.	0,03 - 0,12	0,06 - 0,24	
PARACETAMOLUM	p.o.	0,5 - 1,0	2,0 - 4,0	Nedoporučuje se překračovat.
	p.rect.	0,5	max. 0,5 - 1,5	
PARAFFINUM LIQUIDUM	p.o.	15,0 - 30,0		
PARALDEHYDUM	i.m., p.rect.	5 - 10 ml		
PENICILLAMINUM	p.o.	0,125 - 1,0	1,0 - 2,0	
PENTAMIDINI DIISETIONAS	i.m.	0,004/kg	0,3/měsíc	pneumonie *Pneumocystis carinii*
PENTOBARBITALUM	p.o.	0,1	0,2 - 0,4	Sedativní dávky jsou 10x menší.
	i.m.	0,15 - 0,2		
	i.v.	0,1	0,2 - 0,5	
PENTOXIFYLLINUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,3 - 0,6	
		0,4 - 0,6	0,8 - 1,2	lékové formy s řízeným uvolňováním
	i.v.	0,1 - 0,3		
	intraart.	0,1 - 0,3		
PEPSINI PULVIS	p.o.	0,3 - 1,0	1,0 - 3,0	
PERPHENAZINUM	p.o.	0,004 - 0,016	a 0,064	
	i.m.	0,005 - 0,01	0,015 - 0,03	
	i.v.	do 0,005	a 0,03	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
PETHIDINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,05 - 0,15	0,3 - 0,9	po 4 h
	i.m., s.c.	0,025 - 0,1	0,15 - 0,6	
	i.v.	0,025 - 0,05	0,05 - 0,15	d.max.s. 0,1, d.max.p.d. 0,3
PETROSELINI RADIX	p.o.	1,0	6,0	
PHENACETINUM	p.o.	0,15 - 0,4	max. 1,5	
PHENAZONUM	loc.	5% roztok (ušní kapky)		
PHENOBARBITALUM NATRICUM	p.o.	0,03 - 0,12	0,1 - 0,3	
	i.m., i.v., s.c.	0,04 - 0,2	0,04 - 0,2	
PHENOLSULFOPHTHALEINUM	i.v.	0,1		zkouška funkce ledvin
PHENOLUM	ext.	0,5 - 1% roztok		lokálně anestetický účinek
	inj.	10 ml		opich vnitřních hemeroidů
PHENOXYMETHYLPENICILLINUM	p.o.	400 - 800 tis. m.j. (0,25 - 0,5)	1,6 mil. m.j.	dílčí dávky po 4 h
PHENTOLAMINI MESILAS	i.m., i.v.	0,005 - 0,01		před operací
PHENYLALANINUM	p.o.	do 0,1/kg		s UV zářením při vitiligo
PHENYLBUTAZONUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,3 - 0,6	Nedoporučuje se kombinace s chlorochinem.
				Při déletrvající léčbě nutné sledovat krevní obraz.
			0,1 - 0,2	obvyklé udr ovací dávky
	p.rect.	0,25 - 0,5	0,25 - 0,5	supp.
	i.m.		0,006 - 0,12/kg	Postupně se redukuje na polovinu, dále se podává obden, ev. 2x/týden.

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
PHENYLEPHRINUM	loc.	2,5% a 10% oční kapky		1 kapka 0,5 - 1 h před chirurgickým zákrokem
	intranas.	0,25 - 0,5%		2 - 3 kapky; dekongesce sliznic
	s.c., i.m.	0,002 - 0,005		úvodní dávka
		dále 0,001 - 0,01		podle klinického účinku (hypotenzní stavy)
	i.v.	0,1 - 0,5 mg		hypotenzní stavy
		1 : 20 000		přísada k lokálním anestetikům
	inhal.	0,24 mg		
PHENYLPROPANOLAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025	0,075 - 0,1	
		do 0,05	0,1	ve formě s řízeným uvolňováním
PHENYTOINUM NATRICUM	p.o.	0,3	0,3 - 0,4	udr ovací denní dávka
	i.v.	0,01 - 0,015/kg (0,05/min)		status epilepticus
		0,0035 - 0,005/kg		intoxikace digitalisem
PHOLCODINUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,015 - 0,04	
PHTHALYLSULFATHIAZOLUM	p.o.	0,015 - 0,025/kg - max. 2,0	0,1/kg - max. 8,0	
PHYSOSTIGMINI SULFAS	i.m., s.c.	0,5 - 2,0 mg	1 - 4 mg	
	i.v.	0,001/min		
	loc.	0,25 - 0,5% oční kapky		
		0,25% oční mast		
PHYTOMENADIONUM	i.m., i.v.	0,002 - 0,025	0,005 - 0,03, max. 0,05	
	p.o.	5 - 15 mg	5 - 30 mg	
PILOCARPINI NITRAS	loc.	0,5 - 4% oční kapky		max. 0,02 - 0,04
	s.c.	0,001 - 0,005 (v 1% roztoku)	0,001 - 0,01	
	p.o.	0,005	0,005 - 0,01	max. 0,02 - 0,04
PINDOLOLUM	p.o.	0,005 - 0,01	0,01 - 0,045, ev. 0,06	
PIPERAZINUM HEXAHYDRICUM	p.o.	2,0 - 4,0	2,0 - 4,0	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
PIROXICAMUM	p.o.	0,01 - 0,02	0,01 - 0,04	
	i.m.	0,02	0,02	
	loc.	0,5% gel - 1 g (5 mg piroxikamu)	4 g gelu	3 - 4x denně vtírat
PIVAMPICILLINUM	p.o.	0,5 - 1,0	1,0 - 2,0	1,5 - 2,0 g při kapavce
PLANTAGINIS FOLIUM	p.o.	1,5	6,0	
POLYGALAE RADIX	p.o.	1,0	3,0	
POLYGONI AVICULARIS HERBA	p.o.	1,5	6,0	
POLYMYXINI B SULFAS	loc.	0,1% roztok, mast		
	i.v. inf., i.m.	1,5 - 2,5 mg/kg	1,5 - 2,5 mg/kg	
POVIDONUM IODINATUM	loc.	4 - 10% roztok		
		1% roztok		výplach úst
	vagin.	0,2		globule
PRAZIQUANTELUM	p.o.	0,015 - 0,04/kg	0,015 - 0,075/kg	
PRAZOSINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,5 - 5 mg	0,006 - 0,02	
PREDNISOLONUM	i.v., i.m.	0,002 - 0,03	0,004 - 0,06	i.m. 25,0 - 100,0 mg 2x týdně
	intraartic.	0,005 - 0,025		(acetat)
	p.o.	0,005 - 0,03	0,005 - 0,06	
	p.rect.	0,02		nálev
	loc.	0,5 - 1,0% oční kapky		(acetat)
		0,5% oční mast		
PREDNISONUM	p.o.		0,005 - 0,06	
	p.rect.		0,05 - 0,2	
PRIMAQUINI DIPHOSPHAS	p.o.		0,015	14 dní; přepočteno na bázi
			nebo 0,045 1x/týden	
PRIMIDONUM	p.o.	0,1 - 0,25	0,1 - 1,5	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
PRIMULAE RADIX	p.o.	0,2	1,0	
PROBENECIDUM	p.o.	0,25 - 0,5	0,5 - 2,0	
PROCAINAMIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,25 - 0,5	1,5 - 3,0	
			2,0	lékové formy s řízeným uvolňováním - úvodní dávka
		1,5	4,5	lékové formy s řízeným uvolňováním - pokračování
	i.v.	0,1 po 5 min (0,25 - 2,0 mg/min)	1,0	udr ovací infuzní dávka
PROCAINI BENZYLPENICILLINUM	i.m.	0,6 - 3 mil. m.j.	0,6 - 3 mil. m.j.	
PROCAINI HYDROCHLORIDUM	s.c., i.m.		max. 0,25% - 750 ml max. 0,5% - 250 ml max. 1,0% - 100 ml max. 2,0% - 30 ml	k infiltrační a svodné anestezii
	i.v.	0,05 - 0,1	0,05 - 1	pomalu v 1% roztoku
PROCHLORPERAZINI HYDROGENOMALEAS	p.o.	0,005 - 0,01	0,015 - 0,04	antiemetikum
		0,005 - 0,03	0,015 - 0,15	neuroleptikum
	p.rect.	0,025	0,05	antiemetikum
	i.m.	0,005 - 0,02	0,04 - 0,16	
	i.v.	0,005 - 0,01	0,04	
PROGESTERONUM	i.m.	0,06		progesteronový test
	i.m.		0,05 - 0,1	depot
PROMETHAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,0125 - 0,05	0,025	hypersenzitivní reakce
		0,025	0,05	kinetózy
		0,025		antiemetikum
		0,0125 - 0,025		sedace
	i.m., i.v.	0,025	0,05	hypersenzitivní reakce, max. 0,1
		0,025 - 0,05		sedace
		0,025 - 0,05	0,05	pre- a postoperační sedace
		0,0125 - 0,025	0,025 - 0,05	antiemetikum
		0,025 - 0,075		porodnictví

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
PROPANTHELINI BROMIDUM	p.o.	0,015 - 0,03	0,075 - 0,12	
PROPRANOLOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,04 - 0,12	0,12 - 0,24	hypertenze
		0,04 - 0,16	0,08 - 0,32	angina pectoris
		0,01 - 0,03	0,03 - 0,12	arytmie
		0,06 - 0,12	0,18 - 0,24	infarkt myokardu
			0,16 - 0,24	profylaxe migrény
		0,04	0,08 - 0,12	třes
	i.v.	0,001 - 0,003	0,001 - 0,005	
PROPYLTHIOURACILUM	p.o.	0,05 - 0,2	0,15 - 0,6	
			0,05 - 0,2	obvyklé rozmezí
PROPYPHENAZONUM	p.o., p.rect.	0,15 - 0,3	0,45 - 0,75	
PROTAMINI SULFAS	i.v.	max. 0,05		Dávka závisí na předchozí dávce heparinu.
PROTIRELINUM	i.v.	0,5 mg		
PROXYPHYLLINUM	p.o.	0,3	0,9	
		0,6	0,9	na noc
PSYLLII SEMEN	p.o.	5,0	a 10	
PYRAZINAMIDUM	p.o.	0,5 - 1,0 (0,015 - 0,03/kg)	1,5 - 2,5	d.max.p.d. 3,0
PYRIDOXINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,02 - 0,1	0,05 - 0,3	
	i.m., i.v.	0,02 - 0,1	0,05 - 0,3	
PYRIMETHAMINUM	p.o.		0,05 - 0,075	spolu se sulfadoxinem (1,0 - 1,5 g)
QUERCUS CORTEX	p.o.	1,5	3,0	koupele 5,0 - 20,0/l vody
QUINIDINI SULFAS	p.o.	0,2 - 0,4 (přepočteno na bázi)	0,4 - 1,2	antiarytmikum
	p.o.		0,25 - 4,0	supraventrikulární tachykardie
QUININI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,6	1,8	malárie (*P. falciparum*) - 7 dní (po 8 h), max. 0,5 - 2,0
	i.v.	0,005 - 0,01/kg		úvodní dávka - během 0,5 h
		0,01/kg	0,03/kg	udr ovací dávka - během 4 h - po 8 h

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
RANITIDINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,15 - 0,3	0,3 - 0,6	
	i.m., i.v.	0,05		
	inf.		0,15 - 0,3 (25 mg/h)	
	p.o.	0,15	0,3 - 0,45	Zollinger-Ellisonův syndrom
RATANHIAE RADIX	p.o.	1,5	3,0	
RESERPINUM	p.o.	0,05 - 0,25 mg	0,1 - 3,0 mg, obvykle do 0,5 mg	
RESORCINOLUM	loc.	1 - 5% roztok		
RHAMNI PURSHIANAE CORTEX	p.o.		0,02 - 0,04	jednotlivá dávka v noci
RHEI RADIX	p.o.		1,0	
RIBOFLAVINUM	p.o., i.m.	0,01	0,01 - 0,03	
RICINI OLEUM	p.o.	15 ml, jako antidotum 50 ml		
RIFAMPICINUM	p.o.	0,45 - 0,6	0,45 - 0,6	
	i.v.	0,6	1,2	
ROSMARINI ETHEROLEUM	loc.	6 - 10% mast		
ROXITHROMYCINUM	p.o.	0,15 - 0,3	0,3 - 0,6	
SALBUTAMOLUM	nebul.		0,01 - 0,02	v dílčích dávkách
	inhal.	0,1 - 0,2 mg	0,8 mg	druhá dávka nejdříve za 5 min, další za 3 h
	s.c., i.m., i.v.	0,5 mg	1 - 3 mg	po 4 h
	i.v.	0,25 mg		status asthmaticus (úvodní dávka)
	inf.	3 - 20 mg/min		pokračování
	inf.	10-45 mg/min		zástava předčasného porodu
	p.o.	4,0 mg	12 - 16 mg	zástava předčasného porodu
SALVIAE HERBA	p.o.	1,5	3,0	k výplachům úst 2,5/100 ml vody
SAMBUCI FLOS	p.o.	10,0 - 15,0		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
SCOPOLAMINI HYDROBROMIDUM	s.c., i.m.	0,2 - 0,6 mg	0,5 - 1,0 mg	premedikace
	p.o.	0,3 mg	0,9 mg	antiemetikum - 30 min před cestou, ev. dále po 6 h; d.max.s. 1,0 mg, d.max.p.d. 3,0 mg
	i.v., i.m., s.c.	0,2 - 1,0 mg		
	loc.	0,25% oční roztok		max. 1 - 3 mg
SELENII DISULFIDUM	ext.	2,5% roztok, 1% šampon		
SENNAE FOLIUM	p.o.		0,5 - 2,0	
SENNAE FRUCTUS ACUTIFOLIAE	p.o.		1,0 - 2,5	
SENNAE FRUCTUS ANGUSTIFOLIAE	p.o.		1,0 - 2,5	
SOMATOSTATINUM	i.v.	0,25 mg/h		kontinuální infuze - pokračovat 1 - 2 dny po zástavě krvácení
SOMATROPINUM	s.c., i.m.		0,06 mg (0,16 m.j.)/kg 3 x týdně	
SORBITOLUM	p.o., p.rect.	20,0 - 50,0		
SPECTINOMYCINI HYDROCHLORIDUM	i.m.	2,0 - 4,0	2,0 - 4,0	
SPIRAMYCINUM	p.o.	1,0 - 2,5	2,0 - 5,0	
	i.v.	1,5 mil. m.j.	4,5 mil. m.j.	
SPIRONOLACTONUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,025 - 0,4; obvykle 0,1	
STRAMONII FOLIUM	p.o.	0,15	0,45	max. 0,6 - 1,8
STRAMONII PULVIS NORMATUS	p.o.	0,15	0,45	max. 0,6 - 1,8
STREPTOKINASUM	i.v. inf.	1,5 mil. m.j. po 1 h	max. 3 mil. m.j. po 1 h	akutní infarkt myokardu
	intracor.	20 tis. m.j.		úvodní dávka
		2 tis. m.j./min po 1 h		pokračování
		250 tis. m.j./0,5 h v F1/1 nebo G5		plicní embolie - úvodní dávka
			100 tis. m.j./h po dobu 24 h	pokračování
		250 tis. m.j./0,5 h po 1 h		hluboká ilní trombóza
		1 tis.00 m.j./h		pokračování - 3 dny
		250 tis. m.j./0,5 h		arteriální trombóza nebo embolie
		250 tis. m.j./0,5 h		pokračování 1 - 3 dny, poté 100 tis. m.j./h

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
STREPTOMYCINI SULFAS	i.m.	0,5 - 1,0	1,0	max. 1,5
STRYCHNI SEMEN	p.o.	0,1	0,2	max. 0,2
SULFACETAMIDUM NATRICUM	loc.	10% oční kapky nebo mast		1 - 2 kapky po 2 - 3 h
SULFADIAZINUM	loc.	1% krém (Ag^2 sůl)		Při systémovém podání závisí velikost podané dávky na vyvolávajícím agens a záva nosti infekce.
	p.o.		2,0 - 4,0, max. 6,0	
	i.v.		2,0 - 3,0	
SULFADIMIDINUM	i.v., i.m., p.o	3,0	4,0 - 8,0 (p.o.)	úvodní dávka
		1,5	6,0	udr ovací dávka - po 6 h
SULFADOXINUM	p.o.	1,5	1,5	
SULFAFURAZOLUM	p.o.	2,0	6,0 - 8,0	
SULFAMETHIZOLUM			1,5 - 4,0	ve 3 - 4 dílčích dávkách
SULFAMETHOXAZOLUM	p.o.	0,8 - 1,0	1,6 - 2,0	dávkování v kombinaci s trimethoprimem
SULFAMETHOXYPYRIDAZINUM	p.o.	1,0		1. den
		0,5		další dny (v 1 dávce)
SULFASALAZINUM	p.o.	1,0 - 2,0	4,0 - 8,0	
	p.rect.	1,0	2,0 - 3,0	
SULFATHIAZOLUM	loc.	2 - 5% krém nebo mast		
		1% oční mast		a 4x denně
SULFINPYRAZONUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,2 - 0,8	
SULFUR AD USUM EXTERNUM	ext.	a 10% krémy, masti		
SULINDACUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4	s jídlem
SULPIRIDUM	p.o.	0,2 - 0,4 (a 1,2)	0,4 - 2,4	
	i.m.		0,2 - 0,3	
SUXAMETHONII CHLORIDUM	i.v.	0,02 - 0,08	max. 0,1	
	inf.	2,5 - 4,0 mg/min		0,1 - 0,2% roztok
	i.m.	2,5 - 4,0 mg/kg	max. 150 mg	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
TAMOXIFENI DIHYDROGENOCITRAS	p.o.	0,01 - 0,02	0,02 - 0,04	
TARAXACI RADIX CUM HERBA	p.o.	2,0	8,0	
TEMAZEPAMUM	p.o.	0,01 - 0,03	0,01 - 0,06	0,02 - 0,04 - premedikace
TENOXICAMUM	p.o., p.rect.	0,01 - 0,02	0,01 - 0,02	
TERBUTALINI SULFAS	inhal.	1 - 2 inhalace (po 0, 25 mg)	max. 0,002 (tj. 8 inhalací)	astma
			max. 0,008/h	
			dále 0,016/24 h	
	p.o.	2,5 - 5,0 mg	7,5 - 15 mg	
	s.c., i.m., i.v.	0,25 - 0,5 mg	1,0 - 2,0 mg	
	inf.	10 mg/min		hrozící předčasný porod
		po 10 min lze zvýšit o 5 mg/min		do zastavení kontrakcí
		max. 25 mg/min		
TERFENADINUM	p.o.	0,060	0,12	
TESTOSTERONI ENANTAS	i.m., s.c.		0,05 - 0,4 po 2 - 4 týdny	
TESTOSTERONI PROPIONAS	i.m.		0,01 - 0,1 2 - 3 x týdně	
TETRACAINI HYDROCHLORIDUM	loc.	0,5 - 1,0% roztok		anestezie v očním lékařství
		0,5 - 1% krém, 0,5% mast		
		0,25 - 0,5% roztok		povrchová anestezie (na sliznici)
	inj.	0,5% roztok, max. 0,015		pro spinální anestezii
TETRACOSACTIDUM	i.m., i.v.	0,25 mg		diagnostika funkce nadledivn
	i.m. (depot)		0,001	terapie
			0,001 po 2 - 3 dny	po ústupu příznaků
			0,5 mg po 2-3 dny nebo 0,001/týden	udr ovací dávka
TETRACYCLINUM	p.o.	0,25 - 1,0	4,0	
	i.v.		1,0 - 2,0	max. v 0,5% roztoku
	i.m.		0,2 - 0,3	v dílčích dávkách

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
THEOBROMINUM	p.o.	0,25	0,75	
THEOPHYLLINUM	p.o.	0,06 - 0,25	0,06 - 0,5, ev. 1,0	
THIAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,1	0,03 - 0,3	
	i.m., s.c.	0,025 - 0,1	0,1	
THIAMINI NITRAS	p.o.	0,030	a 0,3	
THIAMPHENICOLUM	p.o., i.m., i.v.		1,5 (ev. a 3,0/den)	v dílčích dávkách
THIOPENTALUM NATRICUM ET NATRII CARBONAS	i.v.	0,075 - 0,25 v 2,5 - 5% roztoku		d.max.s. 1,0; d.max.p.d. 2,0
THIORIDAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,01 - 0,03, ev. a 0,1	0,03 - 0,6	
THYMI HERBA	p.o.	1,5	6,0	k obkladům 5 g/100 ml vody
TIABENDAZOLUM	p.o.	0,025/kg	50 mg/kg	2 a více dní; d.max.p.d. 3,0
TICARCILLINUM NATRICUM	i.v., i.m.	1,0 - 8,0, obvykle do 3,0	15,0 - 20,0	
TICLOPIDINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,25	0,5	s jídlem
TILIAE FLOS	p.o.	1,5	6,0	
TIMOLOLI HYDROGENOMALEAS	loc.	0,25 - 0,5% oční kapky		glaukom
	p.o.	0,005 - 0,01	0,035 - 0,045, ev. a 0,06	léčba hypertenze
TINIDAZOLUM	p.o.		1,5 - 2,0	2 - 5 dní
	i.v.		0,8 (400 ml 0,2% roztoku)	nelze-li podat p.o.
TOBRAMYCINUM	i.m., i.v.	0,001 - 0,002/kg		
	inf.		0,003 - 0,005/kg během 30 - 60 min	v 50 - 100 ml F1/1 nebo G5
	loc.	0,3% kapky nebo mast		
TOCOFEROLUM ALFA	p.o.		0,003 - 0,02	léčba a prevence deficience
(VITAMINUM E)			a 2,0	svalová dystrofie
			0,045 - 0,2	cystická fibróza
TOLBUTAMIDUM	p.o.		1,0 - 2,0	úvodní dávka
			0,25 - 2,0	udr ovací dávka

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
TOLNAFTATUM	loc.	1% lékové formy (roztok, krém, zásyp)		2x denně
TORMENTILLAE RADIX	p.o.	1,5	4,5	
TRETINOINUM	loc.	0,01 - 0,1% lékové formy		
TRIAMCINOLONUM	p.o.		0,004 - 0,048	
	i.m.	0,04		
	intraartic.	do 0,03 - 0,04		
	loc.	0,1% krémy, masti, locia		
	inhal.	0,2 mg	max. 1,6 mg	3 - 4x denně
TRIAMTERENUM	p.o.	0,1	0,3	
TRIFLUOPERAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,002 - 0,005	0,004 - 0,01	psychózy - úvodní dávka
			0,015 - 0,04	udr ovací dávka - ve 2 dílčích dávkách
	i.m.		0,001 - 0,003 (ev. a 0,006)	akutní psychotické stavy - v dílčích dávkách
	p.o.	0,001 - 0,002	0,002 - 0,004 (ev. a 0,006)	antiemetikum
		0,001 - 0,002	0,002 - 0,004	úzkostné stavy
TRIFOLII FIBRINI FOLIUM	p.o.	0,5	1,5 - 3,0	
TRIMECAINI HYDROCHLORIDUM	loc. inj.	1 - 2% roztok; 2% gel		povrchová anestezie
		0,5 - 1,0% roztok		infiltrační anestezie
		1 - 2% roztok		svodná anestezie
		2% roztok (max. 10 ml)		zubní lékařství
	i.v.	10 ml 1% roztoku (0,1)		komorové arytmie - úvodní dávka
	inf.	0,1 - 0,2 v 500 ml		pokračování
	i.v.	0,05 - 0,1		prevence komorových arytmií po akutním infarktu myokardu
	i.m.	0,3		
TRIMETHADIONUM	p.o.		0,9	úvodní dávka - v dílčích dávkách
			zvyšovat o 0,3 (max. 2,4)	zvyšovat po 1 týden

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
TRIMETHOPRIMUM	p.o.	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4	
	i.v.	0,15 - 0,25	0,3 - 0,5	
TRIMIPRAMINI HYDROGENOMALEAS	p.o.		0,05 - 0,075	úvodní dávka
			zvyšovat na 0,15 - 0,3	
			0,075 - 0,15	udr ovací dávka
TROLAMINUM	intrauric., ext.	10% ušní kapky		ext. - emulgátor
TROMETAMOLUM	i.v. inf.	roztok 0,3 mol/l, nejméně 1 h		léčba metabolické acidózy
TROPICAMIDUM	loc.	1 - 2 kapky 0,5% roztoku		navození mydriázy
		1 - 2 kapky 1% roztoku,		navození cykloplegie, lze zopakovat za 5 min, ev. za dalších 20 - 30 min
TROXERUTINUM	p.o.	0,3	0,3 - 0,6	
TRYPTOPHANUM	p.o.		3,0 - 6,0	rozdělit do několika dávek
TUBOCURARINI CHLORIDUM	i.v.	0,01 - 0,03	max. 0,04	
		0,005 - 0,01 po 30 - 60 min		udr ovací dávka
UREA	i.v.		0,5 - 1,5/kg, max. 120,0	
UROKINASUM	i.v. inf.	4,4 tis. m.j./kg - během 10 min		plicní embolie - úvodní dávka
		4,4 tis. m.j./kg - během 12 h		pokračování
	intracor.	6 tis. m.j./min - během 2 h nebo 2 - 3 mil. m.j. během 45 - 90 min		akutní infarkt myokardu
	i.v. inf.	0,4 - 0,6 mil. m.j.		arteriální trombóza - úvodní dávka
		0,1 - 0,15 mil. m.j./h		pokračování
UVAE URSI FOLIUM	p.o.	3,0	12,0	příprava macerátu za studena
VALERIANAE RADIX	p.o.	2,0 - 3,0	6,0 - 9,0	
VANCOMYCINI HYDROCHLORIDUM	i.v.	0,125 - 1,0 v 10 ml	0,5	Všechny dávky odpovídají bázi ve 4 dílčích dávkách ve 100 - 200 ml G5 nebo F1/1.
			nebo 1,0	ve 2 dílčích dávkách
			0,5 - 2,0	*lostri ium ifficile* (stafylokoková enterokolitida, pseudomembranová kolitida) - ve 4 dílčích dávkách

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé

Název	Způsob podání	Dávky (g)*		Poznámka
		Jednotlivá dávka	Denní dávka	
VERAPAMILI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,04 - 0,12	0,24 - 0,48, obyč. 0,32	hypertenze
		0,12	0,360	angina pectoris
			0,12 - 0,48	supraventrikulární arytmie
	i.v.	0,005 - 0,01/0,5 min		lze zopakovat za 10 min
VERBASCI FLOS	p.o.	1,5	3,0 - 4,5	
VINBLASTINI SULFAS	i.v.	0,1 - 0,3 mg/kg	6,0 mg/m^2, 1x týdně; max. 0,5 mg/kg týdně	
VINCRISTINI SULFAS	i.v.	0,025 - 0,075 mg/kg 1x týdně		akutní leukemie (obvykle v kombinaci s dalšími cytostatiky)
VITAMINUM A	p.o.		100 tis. m.j.	nárazová dávka, max. 50 tis. m.j.
			10 - 50 tis. m.j.	udr ovací dávka
	i.m.		100 tis. m.j.	nárazová dávka
			50 tis. m.j.	udr ovací dávka
ARFARINUM NATRICUM	p.o.		0,01	první 2 dny
			0,003 - 0,009	udr ovací dávka (dávkování podle laboratorní kontroly)
XANTINOLI NICOTINAS	p.o.	0,4	1,5	
XYLOMETAZOLINI HYDROCHLORIDUM	intranas.	0,1% roztok		2 - 3x denně
	intraocul.	0,05% roztok		
ZIDOVUDINUM	p.o.	0,2 - 0,3	1,2 - 1,8	ve 4 - 6 dílčích dávkách
			0,5 - 1,5	asymptomatičtí nemocní
	i.v. inf.		0,0025/kg po 4 h	symptomatičtí HIV-nemocní
ZINCI SULFAS HEPTAHYDRICUS	p.o.	do 0,22	do 0,66	
ZINCI UNDECYLENAS	ext.	1 - 20% mast, krém, pudr		
ZOPICLONUM	p.o.	3,75 - 15,0 mg, obvykle 7,5		

není-li uvedeno jinak

Tabulka V: Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti N

Dávkování léčiv u kojenců a dětí do 15 let věku se s ohledem na rozdíly ve farmakokinetice nedá zcela uspokojivě odvodit z dávek pro dospělé pouze podle lineárních přepočtů podle věku. Pro určení dávek léčiv pro děti jsou důležitými činiteli vedle věku též hmotnost, povrch těla, ale též individuální vnímavost, zdravotní stav a jiné okolnosti. K tomu ještě často přistupuje různé dávkování téhož léčiva při různých onemocněních. Z uvedených důvodů nebylo zpracování této tabulky jednoduchou záležitostí.

Nejspolehlivější informace o dětských dávkách podávají obvykle výrobci v příbalových informacích. Pokud příslušné údaje v těchto informacích chybí, může být učiněn odhad dávek některou z metod založených na věku a hmotnosti nebo povrchu těla dítěte. Dávky mnoha léčiv však nejsou prostou lineární funkcí tělesné hmotnosti nebo věku. Zkušenost ukázala, že u mnoha léčiv je korelace dávek těsnější s povrchem těla, a proto se tělesný povrch pokládá za vhodnější a přesnější hodnotu, na níž by bylo možno vztáhnout dávky léčiv pro děti.

Pro přepočet dávky z tělesného povrchu je možno použít vzorec:

$$\text{přibližná dávka pro děti} = \frac{\text{povrch těla dítěte v m}^2}{1{,}73} \cdot \text{dávka pro dospělé},$$

přičemž povrch těla dítěte v m^2 se určuje buď pomocí nomogramů (z tělesné výšky a hmotnosti dítěte), nebo pomocí empirického vzorce:

$$\text{povrch těla dítěte v m}^2 = \frac{7 \cdot \text{věk (}roky\text{)} + 45}{100}$$

Získané hodnoty odpovídají přibližně údajům v následující tabulce:

Tab. N-1

Věk dítěte (roky)	Hmotnost dítěte (kg)	Přibližný povrch těla (m^2)	Přibližné procento dávky dospělých
novorozenec	3,5	0,23	13
2/12	5	0,27	16
6/12	7,5	0,35	20
1	10	0,42	24
2	12,5	0,49	28
3	14	0,59	34
4	16,5	0,69	39
5	18	0,72	42
6	20	0,80	46
7	23	0,87	50
8	26	0,93	54
9	29	1,02	58
10	32	1,12	65
11	36	1,20	69
12	39	1,27	73
13	45	1,41	81
14	50	1,50	87
15	55,5	1,59	92
dospělý	65	1,73	100

Uvedená tabulka dětských dávek obsahuje obvyklé terapeutické dávky pro děti u běžně používaných oficinálních léčiv. Při jejich určování se přihlíželo k povrchu těla a k hmotnosti, byly však sestaveny podle věku do tří věkových kategorií, neboť věk je jediný vhodný činitel, který lékárník může dosud zjistit z lékařského předpisu. Dávky jsou vyjádřeny v gramech (g) nebo v mezinárodních jednotkách (m.j.) na kilogram. Vztahují se na děti do stáří 15 let; od tohoto věku lze lidský organismus považovat z hlediska farmakologického a klinického účinku léčiv již za dospělý.

V každé věkové skupině nejnižší dávka odpovídá nejnižšímu věku a nejvyšší dávka nejvyššímu věku; dávky pro jednotlivé roky příslušných skupin se vypočítají interpolací. U léčiv, která nejsou v této tabulce uvedena, se dětské dávky vypočítávají z dávek pro dospělé podle shora uvedeného přehledu vztahů.

Denní dávkou, není-li uvedeno jinak, se rozumí trojnásobek dávky jednotlivé.

Dětské dávky léčiv uvedené v tabulkách, nebo uvedeným způsobem vypočtené, jsou směrodatné pro předpisování i vydávání léků; jejich překročení lékař vyznačí na předpisu vypsáním příslušné dávky slovy a připojením vykřičníku (!) obdobně jako u dávek maximálních. Není-li překročení dětské dávky řádně označeno, požádá lékárník příslušného lékaře o doplnění lékařského předpisu. V případě nedosažitelnosti lékaře opraví lékárník dávku na terapeutickou, úpravu potvrdí svým podpisem a dodatečně lékaře o změně uvědomí.

Poznámka: Protože se liší detoxikační a exkreční schopnosti dětí nedonošených a novorozenců od dětí starších, vyžadují tyto skupiny zvláštní pozornosti předpisujícího lékaře pří úpravě dávek, zejména u antibiotik.

Seznam zkratek použitých v tabulce - viz *Tabulka IV: Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé* (str. 722).

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
ACETAZOLAMIDUM	p.o.	0,008 - 0,03				
ACETYLCYSTEINUM	p.o.		0,2/den	0,4/den	0,6/den	
ACICLOVIRUM	i.v.	0,015 - 0,03 (0, 75 - 1,5/m^2)				ve 3 dílčích dávkách po 8 h
	i.v.	0,03				u novorozenců, ve 3 dílčích dávkách po 8 h
ACIDUM ACETYLSALICYLICUM	p.o.	0,1	0,08 - 0,15	0,15 - 0,25	0,25 - 0,5	antirevmatikum
	p.o.	0,065				antipyretikum
ACIDUM ALGINICUM		0,025				
ACIDUM ETACRYNICUM	p.o.	0,025				starší 2 let, podle potřeby lze zvyšovat o 0,025/den (max. na 0,1 g)
ACIDUM NALIDIXICUM	p.o.	0,05 - 0,055				ve 4 dílčích dávkách
	p.o.	0,03 - 0,033				dlouhodobé podávání
ALFENTANILI HYDROCHLORIDUM	inf.	50 - 100 mg/kg (bolus) nebo 0,5 - 1 mg/kg/min				podle stavu nemocného
	i.v.	30 - 50 mg/kg, ev. dalších 15 mg/kg				při řízeném dýchání
ALLOPURINOLUM	p.o.	0,01			0,3	
ALOXIPRINUM	p.o.		0,1	0,2	0,4	
AMFETAMINI SULFAS	p.o.			0,002 - 0,004	0,004 - 0,01	
	s.c., i.m.			0,001 - 0,002	0,002 - 0,005	
AMINOPHYLLINUM	p.o., i.v.	0,012		0,005 - 0,1	0,1 - 0,25	
	p.rect.	0,015		0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	
AMITRIPTYLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.				0,0125 - 0,025	na noc (léčba enuresis) - max. 3 měsíce (do 10 let věku)
	p.o.				0,025 - 0,05	na noc (léčba enuresis) - max. 3 měsíce (od 11 let věku)
AMOXICILLINUM NATRICUM	p.o.	0,02 - 0,04				při tělesné hmotnosti do 20 kg
	p.o.	0,375 - 0,75				do 10 let věku - ve 3 dílčích dávkách po 8 h

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
AMOXICILLINUM TRIHYDRICUM	i.m.	0,05 - 0,1				do 10 let věku
AMPICILLINUM NATRICUM	p.o.	0,05 - 0,1	0,25 - 0,75	0,75 - 1,5	1,5 - 3,0	
	i.m., i.v.	0,05 - 0,4	0,25 - 1,0	1,0 - 2,0	2,0 - 4,0	
APOMORPHINI HYDROCHLORIDUM	s.c.	70 mg/kg/dávku		0,5 - 1 mg	1 - 2 mg	nejvyšší jednotlivá dávka 5 mg
ARGENTI NITRAS	intraocul.		2 gtt. 0,5 - 1,0% roztoku do ka dého očního vaku			u novorozenců
ARGININI HYDROCHLORIDUM	inf.	0,5				v diagnostice
	p.o.	0,5 - 2				hyperamonemie
	i.v.	0,2 - 0,8/kg během 4 h				hyperamonemie - úvodní dávka
	cont.inf.	0,2 - 0,8				hyperamonemie - udr ovací dávka
ASTEMIZOLUM	p.o.				0,005/den	
ATROPINI SULFAS	p.o., s.c.	0,008 mg	0,06 - 0,2 mg	0,2 - 0,3 mg	0,3 - 0,5 mg	
AZATHIOPRINUM	p.o.	0,002 - 0,003		0,02 - 0,04	0,04 - 0,15	
BACAMPICILLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.				0,2	starší 5 let, 3x denně
BACITRACINUM	p.o.	2 tis. m.j.	6 - 20 tis. m.j.	20 - 40 tis. m.j.	40 - 50 tis. m.j.	
	i.m.	1 tis. m.j.	3 - 10 tis. m.j.	10 - 20 tis. m.j.	20 - 50 tis. m.j	
BACLOFENUM	p.o.	0,75 - 2 mg				do 10 let
	p.o.	2,5 mg				nad 10 let
	p.o.	0,01 - 0,02/den				udr ovací dávka, 1 - 2 roky
	p.o.	0,02 - 0,03/den				udr ovací dávka, 2 - 6 let
	p.o.	0,03 - 0,06/den				udr ovací dávka, 6 - 10 let
BENDROFLUMETHIAZIDUM	p.o.	400 mg				úvodní dávka
	p.o.	50 - 100 mg				udr ovací dávka
BENZATHINI BENZYLPENICILLINUM	i.m.	600 tis. a 1,2 mil. m.j. jednou za 14 dnů				dávkování individuální podle stavu nemocného

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
BENZETHONII CHLORIDUM	ext.	0,02 - 0,5%				
BENZYLPENICILLINUM KALICUM	i.v., i.m.	50 - 100 tis. m.j.	80 - 100 tis. m.j.	100 - 200 tis. m.j.	200 - 600 tis. m.j	3 - 6x denně
BETACAROTENUM	p.o.	0,03 - 0,15				
BETAMETHASONUM	p.o.	0,12 - 0,25 mg	0,25 - 0,6 mg	0,6 - 1,2 mg	1,2 - 3 mg	
BISACODYLUM	p.o., p.rect.			0,005	0,005 - 0,01	
BROMPHENIRAMINI HYDROGENOMALEAS	p.o.	0,4 - 1 mg				do 3 let, ve 4 dílčích dávkách
	p.o.			0,001 - 0,002		3 - 6 let, 3 - 4x denně
	p.o.				0,002 - 0,004	6 - 12 let, 3 - 4x denně
	p.o.				0,012	ve formě s řízeným uvolňováním, 2x denně
BROMHEXINI HYDROCHLORIDUM	p.o.			4 - 8 mg	8 - 16 mg	3x denně
BUDESONIDUM	aerosol	100 - 400 mg (max. 800 mg)				ve 2 dílčích dávkách
	inhal.	0,5 - 1 mg				úvodní dávka, ve 2 dílčích dávkách
		0,25 - 0,5 mg				udr ovací dávka, ve 2 dílčích dávkách
BUSULFANUM	p.o.	60 mg				
CALCII CHLORIDUM DIHYDRICUM		0,3	0,25	0,5	1	dávkování podle diagnózy a stavu nemocného
	i.v.	0,3		0,5 - 1,0	0,5 - 1,0	
CALCII GLUCONAS	p.o.		0,25	0,5 - 0,75	0,75 - 1,0	
	i.v.	0,5	0,1 - 0,2	0,2 - 0,5	0,5 - 2,0	
CARBAMAZEPINUM	p.o.		0,025 - 0,05	0,05 - 0,125	0,125 - 0,25	
CARBENICILLINUM NATRICUM	i.m.	0,05 - 0,10				v dílčích dávkách, vyjádřeno jako carbenicilinum
	i.v.	0,25 - 0,40				v dílčích dávkách, vyjádřeno jako carbenicilinum
CARBO ACTIVATUS	p.o.		1,0 - 2,0	1,0 - 2,0	1,0 - 2,0	
CARBOCISTEINUM				0,0625 - 0,125		od 2 let, 4x denně
					0,25	3x denně

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
CEFACLORUM	p.o.	0,02 - 0,04				do 1 měsíce věku, v dílčích dávkách, max. 1 g/den
	p.o.		0,0625	0,125	0,25	3x denně
CEFADROXILUM	p.o.		0,025/kg/den			v dílčích dávkách
	p.o.			0,25	0,5	2x denně
CEFALEXINUM MONOHYDRICUM	p.o.	0,025 - 0,10				ve 4 dílčích dávkách
CEFALOTINUM NATRICUM	i.m.	0,03 - 0,04				úprava dávek nutná při renální insuficienci
	i.v.	0,08 - 0,16				
CEFAZOLINUM NATRICUM	p.o.	0,025 - 0,05				a od 1 měsíce věku, v dílčích dávkách
	i.m., i.v.	0,025 - 0,10				ve 2 - 4 dílčích dávkách
CEFOTAXIMUM NATRICUM	i.m., i.v.	0,05 - 0,15				ve 2 - 4 dílčích dávkách
CEFOXITINUM NATRICUM	i.m., i.v.	0,08 - 0,16				ve 2 - 3 dílčích dávkách
CEFRADINUM	p.o.	0,025 - 0,05				
	i.m., i.v.	0,05 - 0,1 a i 0,3				
CEFTRIAXONUM NATRICUM	i.m., i.v.	0,05 - 0,075 (max. 2 g/den)				ve dvou dílčích dávkách
	i.v.	0,1 (max. 4 g/den)				meningitida, ve 2 dílčích dávkách
CEFUROXIMUM NATRICUM	i.m.	0,03 - 0,1				ve 3 - 4 dílčích dávkách
CHLORALI HYDRAS	p.rect.	0,025 - 0,05	0,1 - 0,15	0,18 - 0,3	0,4 - 0,8	
CHLORAMBUCILUM	p.o.	0,1 - 0,2 mg	1 - 2 mg/den	2 - 4 mg/den	4 - 7,5 mg/den	
CHLORAMPHENICOLI NATRII SUCCINAS	s.c.	0,025	0,02 - 0,08	0,1 - 0,18	0,16 - 0,4	
	i.v.	0,05				výjimečně
CHLORAMPHENICOLI PALMITAS	p.o.	0,025 - 0,05	0,03 - 0,22	0,26 - 0,44	0,44 - 0,87	
CHLORAMPHENICOLUM	p.o.	0,025 - 0,05	0,02 - 0,125	0,125 - 0,25	0,25 - 0,5	
CHLORDIAZEPOXIDUM	p.o.	0,5 mg		0,005 - 0,015/den	0,015 - 0,03/den	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
CHLOROQUINI DIPHOSPHAS	p.o.	0,025 během 3 dnů				malárie - akutní záchvat
	p.o.	0,005/týden				malárie - profylaxe
	p.o.	0,01 (max. 0,3/den)				amébová hepatitida
	p.o.	0,003				systémový lupus erythematodes
CHLOROTHIAZIDUM	p.o.	0,035				do 6 měsíců věku, ve 2 dílčích dávkách
		0,025				ostatní, ve 2 dílčích dávkách
CHLORPHENAMINI HYDROGENOMALEAS	p.o.			0,002/den		1 - 2 roky, ve 2 dílčích dávkách
	p.o.			0,004 - 0,006/den		2 - 5 let (max. 0,006/den), ve 4 - 6 dílčích dávkách
	p.o.				0,008 - 0,012/den	max. 0,012/den, ve 4 - 6 dílčích dávkách
	p.o.				0,008/den	6 - 12 let, ve formě s řízeným uvolňováním
					0,012/den	nad 12 let, ve formě s řízeným uvolňováním
CHLORPROMAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,002 - 0,003				
	i.m.	0,0015 - 0,002				1 - 5 let max. 0,04/den, více ne 5 let max. 0,075/den
CHLORPROTHIXENI HYDROCHLORIDUM	p.o.				0,01 - 0,025	nad 6 let věku, 3 - 4x denně
CHLORTALIDONUM	p.o.	0,005 ka dý 2. den				do 10 kg tělesné hmotnosti
	p.o.	0,05 ka dý 2. den				10 kg a do 5 let věku
	p.o.	0,05 - 0,1 ka dý 2. den				nad 5 let
CIMETIDINUM	p.o.	0,015 - 0,02				novorozenci nazogastrálně
	i.v., i.m.	0,03				ostatní, ve 3 - 4 dílčích dávkách
CINNARIZINUM	p.o.				0,015	od 5 let, před cestou
					0,0075	po 8 h na cestě
CIPROFLOXACINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,0075 - 0,015				jen v nezbytných případech
	i.v.	0,005 - 0,01				

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
CLINDAMYCINI DIHYDROGENPHOSPHAS	i.m.,i.v.,inf.	0,015 - 0,02				novorozenci, vyjádřeno jako clindamycinum
	i.m.,i.v.,inf.	0,015 - 0,04				starší ne 1 měsíc, v dílčích dávkách
CLINDAMYCINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,003 - 0,006				po 6 h
			0,0375			mladší ne 1 rok nebo s tělesnou hmotností do 10 kg, po 8 h
CLONAZEPAMUM	p.o.	max. 200 mg		250 mg	500 mg	úvodní dávka
			0,5 - 1 mg	1 - 3 mg	3 - 6 mg	udr ovací dávka, do 12 let
					4 - 8 mg	udr ovací dávka, starší 12 let
	i.v., inf.	500 mg				status epilepticus, všechny věkové skupiny do 12 let
CLOROXINUM	p.o.	0,02 - 0,05	0,25			3x denně, děti 1 - 2 roky 4x denně
	p.o.			0,5		2 - 6 let, 3x denně
	p.o.				0,50 - 1,0	nad 6 let, 3 x denně
CLOXACILLINUM NATRICUM	i.v.				2 - 3/den	od 10 let, ve 4 - 6 dílčích dávkách
	i.m.				1 - 1,5/den	od 10 let , ve 4 - 6 dílčích dávkách
	p.o.			0,375/den		do 2 let, ve 4 dílčích dávkách
	p.o.			0,75/den		od 2 do 10 let, ve 4 dílčích dávkách
	p.o.				1,5/den	od 10 let, ve 4 dílčích dávkách
CODEINI DIHYDROGENOPHOSPHAS SESKVIHYDRICUS	p.o.	0,0015	0,003 - 0,005	0,0055 - 0,0075	0,0075 - 0,03	
COLISTINI SULFAS	p.o.	0,75 - 1,5 mil. m.j/den				do tělesné hmotnosti 15 kg, ve 3 dílčích dávkách
		2,25 - 4,5 mil. m.j./den				tělesná hmotnost 15 - 30 kg , ve 3 dílčích dávkách
CORTICOTROPINUM	i.m.	1,6 m.j.				
CUPRI SULFAS	p.o.	20 mg				
CYANOCOBALAMINUM	i.m.			0,1 - 0,3 mg		
CYCLIZINI HYDROCHLORIDUM					0,025	3x denně

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
CYCLOPHOSPHAMIDUM	i.v., p.o.	0,02 - 0,008				úvodní dávka
	p.o.	0,02 - 0,05 2x/týden				udr ovací dávka
	p.o.	0,0025 - 0,003				léčba nefrotického syndromu
CYPROHEPTADINI HYDROCHLORIDUM	p.o.			0,002		od 2 let, 2 - 3x denně, max. 0,012/den
	p.o.				0,004	2 - 3 denně, max. 0,016/den
CYTARABINUM	i.v.	0,1 - 0,2 mg/m^2 (nebo 0,002 - 0,006 mg/kg) během 1 - 24 h po dobu 5 - 27 dní				úvodní dávka, další za 7 - 14 dní
	i.v.,i.m.,s.c.	0,001 - 0,0015 mg/kg				udr ovací dávka, 2x týdně
DACARBAZINUM	i.v.	2 - 4,5 mg				
DAUNORUBICINI HYDROCHLORIDUM	i.v.	0,01 mg/kg (max.)				do 2 let
	i.v.	0,300/m^2 (max.)				celková kumulativní dávka
DEFEROXAMINI MESILAS	i.m.	1 g po 3 - 12 h				max. 6 g/den
	i.v. inf.	0,015/kg/h				max. 0,08 kg/den; Infuzní rychlost se sni uje po 4 - 6 h.
DEMECLOCYCLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,006 - 0,012				v dílčích dávkách
DESMOPRESSINUM	intranas.	5 - 30 mg/den				od 3 měsíců
DESOXYCORTONI ACETAS	i.m.		0,001 - 0,003/den	0,002 - 0,005/den	0,005 - 0,01/den	
DEXAMETHASONUM	p.o., s.c.	0,005/den	0,15 mg	0,25 mg	0,5 mg	
DEXTROMETHORPHANI HYDROBROMIDUM	p.o.			0,005-0,015 po 4 - 8 h, max. 0,06/den		
			0,0025 - 0,005 po 4 - 6 h nebo			od 2 let
			0,0075 mg po 6 - 8 h, max 0,03/den			
DIAZEPAMUM	p.o.	0,12 - 0,8 mg	0,001 - 0,003/den	0,003 - 0,005/den	0,005 - 0,02/den	
	i.v.	0,04-0,2 mg/kg/dávku				

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
DIAZOXIDUM	p.o.	0,003 - 0,005				úvodní dávka (ve 2 - 3 dílčích dávkách)
	p.o.	0,008 - 0,015				udr ovací dávka (ve 2 - 3 dílčích dávkách)
DICLOFENACUM NATRICUM	p.o., p.rect.	0,001 - 0,003				v dílčích dávkách
DICLOXACILLINUM NATRICUM	p.o.	0,0125 - 0,025				v dílčích dávkách
DIGITOXINUM	p.o.	0,02 - 0,04 mg/kg/48 h	0,21 - 0,32 mg	0,32 - 0,6 mg	0,65 - 0,9 mg	saturační dávky na 48 h
	p.o.	0,002 - 0,004 mg	0,021 - 0,032 mg	0,032 - 0,06 mg	0,065 - 0,09 mg	denní udr ovací dávky
DIGOXINUM	p.o.	0,04 - 0,08 mg/kg/48 h	0,43 - 0,65 mg	0,65 - 0,9 mg	0,9 - 2,6 mg	saturační dávky na 48 h
	i.v.	0,027 - 0,053 mg/kg/48	0,29 - 0,43 mg	0,43 - 0,6 mg	0,6 - 1,8. mg	saturační dávky na 48 h
	p.o.	0,016 - 0,08 mg	0,08 - 0,13 mg	0,12 - 0,26 mg	0,26 - 0,5 mg	denní udr ovací dávky
DIHYDROERGOTAMINI MESILAS	p.o.	9 gtt./den, zvyšovat o 1 gtt. denně a do celkové dávky 21 gtt./den podávat 2 - 3 týdny, potom sni ovat a na počáteční dávku				nedávat dětem do 6 let 1 ml = 25 gtt. = 2 mg
DIMENHYDRINATUM	p.o.			0,0125 - 0,025	0,025 - 0,5	2 - 3x denně
DIMERCAPROLUM	i.m..		0,025	0,025 - 0,05	0,05 - 0,1	schéma pro otravu As, Hg, Au: 1. den 2,5 mg/kg ka dé 4 h, 2. den 2,5 mg/kg ka dých 6 h, 3. den 2,5 mg/kg ka dých 12 h
DINATRII CROMOGLYCAS	p.o.	0,4/den				starší 2 let, ve 4 dílčích dávkách
DINATRII EDETAS DIHYDRICUS	inf.	0,04 - 0,07				
DIPHENHYDRAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,005				max. 0,3/den
DIPHENOXYLATI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,006/den				2 - 4 roky, ve 3 dílčích dávkách
	p.o.	0,0075/den				4 - 8 let, ve 3 dílčích dávkách
	p.o.	0,01/den				9 - 12 let, ve 4 dílčích dávkách
	p.o.	0,015/den				více ne 12 let, ve 3 dílčích dávkách

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
DISOPYRAMIDI DIHYDROGENOPHOSPHAS	p.o.	0,01 - 0,03				do 1 roku
	p.o.	0,01 - 0,02				1 - 4 roky
	p.o.	0,01 - 0,015				4 - 12 let
	p.o.	0,006 - 0,015				12 - 18 let
DOMPERIDONUM	p.o.	200 - 400 mg/kg				po 4 - 8 h
	p.rect.	0,004				
DOSULEPINI HYDROCHLORIDUM	p.o.		0,025	0,025 - 0,05	0,05 - 0,1	
DOXYCYCLINUM	p.o.	1. den 0,004 2. a další den 0,002	0,01 - 0,02/den	0,02 - 0,04/den	0,04 - 0,12/den	
DROPERIDOLUM	i.v.	200 - 300 mg/kg				neuroleptanalgezie
	i.m.	200 - 300 mg/kg				premedikace
	p.o.	300 - 600 mg/kg				premedikace
	i.m., i.v.	20 - 75 mg/kg				antiemetikum
EMETINI DIHYDROCHLORIDUM HEPTAHYDRICUM	s.c., i.m.	500 mg/kg				2x denně (do 60 mg/den)
EPHEDRINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	a 0,8 mg/kg/dávku		0,005 - 0,012	0,012 - 0,025	
	i.v.	a 0,4 mg/kg/dávku		0,0025 - 0,005	0,005 - 0,01	
EPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS	s.c., i.v.	0,01 ml/kg/dávku	0,06 - 0,2 ml	0,2 - 0,3 ml	0,3 - 0,5 ml	1 ml = 1 mg
ERGOCALCIFEROLUM	p.o.	denní dávky 0,25 - 0,5 mg (10 tis. - 20 tis. m.j.)				jednorázově 7,5 mg (300 tis.) na měsíc
ERYTHROMYCINI ETHYLSUCCINAS	p.o.	0,04	0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,5	vyjádřeno jako erythromycinum
ERYTHROMYCINI STEARAS	i.m.	0,007				
	i.v.	0,02 - 0,03	0,05 - 0,15	0,15 - 0,25	0,25 - 0,4	
ERYTHROMYCINUM	p.o.	0,024 - 0,04				

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
ETHIONAMIDUM	p.o.	0,015 - 0,02				v 1 dávce, max. 1 g/den, TBC
	p.o.	0,005				v 1 dávce, max. 1 g/den, lepra
ETHOSUXIMIDUM	p.o.			0,25/den	0,5/den	dále zvyšovat po 0,25 (4 - 7 dní)
				(max. 1,0 g)	(max. 1,5 g)	podle terapeutické odpovědi
FENOTEROLI HYDROBROMIDUM	inhal.				100 mg	a 3x denně, max 800 mg/den
	nebul.				0,001	a 3x denně
FENTANYLI DIHYDROGENOCITRAS	i.v.	2 - 3 mg/kg				2 - 12 let
FERROSI FUMARAS	p.o.	0,0035	0,075 - 0,15	0,15 - 0,3	0,3 - 0,6	
FERROSI GLUCONAS		do 0,006				léčba
		0,001				profylaxe
FLUCLOXACILLINUM NATRICUM	p.o., i.m.	0,25/den				do 2 let
	p.o., i.m.	0,5/den				2 - 10 let
	i.v. inf.	0,25 - 1/den				do 2 let
	i.v. inf.	0,5 - 2/den				2 - 10 let
FLUCYTOSINUM	p.o.	1,5 - 4,5 g/m^2/den				do tělesné hmotnosti 50 kg
		0,15 - 0,2				od tělesné hmotnosti 50 kg (ve 4 dílčích dávkách)
FLUDROCORTISONI ACETAS	p.o.	0,1 mg/den				
FOENICULI AMARI FRUCTUS			2,0 - 4,0	3,0 - 5,0	4,0 - 6,0	
FOENICULI DULCIS FRUCTUS			2,0 - 4,0	3,0 - 5,0	4,0 - 6,0	
FUROSEMIDUM	p.o.	0,001 - 0,003	0,004 - 0,02/den	0,02 - 0,06/den	0,065 - 0,15/den	
	i.v.		0,004 - 0,008/dávku	0,01 - 0,02/dávku	0,02 - 0,04/dávku	
GALLAMINI TRIETHIODIDUM	i.v.	1,5 mg/kg				
GENTAMICINI SULFAS	p.o., i.m	0,003 - 0,005				
GLUCOSUM	p.o.	50 - 100				

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
GLUTETHIMIDUM	p.o.			0,125 - 0,25		od 2 let
GLYCEROLUM	p.rect.			1 - 1,5	3,0	
GONADOTROPINUM CHORIONICUM	i.m.			5 - 6 let: 500 m.j.	500 - 1500 m.j.	
GRISEOFULVINUM	p.o.	0,01	max. 0,2	max. 0,2 - 0,4	max. 0,4 - 1,0	
GUAIFENESINUM	p.o.			0,2 - 0,4/den	0,8 - 1,2/den	
GUANETHIDINI SULFAS	p.o.	0,2 mg				
HALOPERIDOLUM	p.o.	25 - 50 mg/ (a 150 mg/den)				
HEPARINUM CALCICUM	i.v.	50 m.j./kg, dále 100 m.j./kg po 4 h				
HEPARINUM NATRICUM	inf.	50 m.j./kg				úvodní dávka
		100 m.j./kg				udr ovací dávka
HEXOBARBITALUM	p.o.	0,0625 - 0,125/den			0,125 - 0,25/den	
HISTAMINI DIHYDROCHLORIDUM	s.c.	0,002/10 kg				k diagnóze v 1% roztoku
HYDROCHLOROTHIAZIDUM	p.o.	0,002	0,003 - 0,004	0,004 - 0,008	0,008 - 0,02	
HYDROCORTISONI ACETAS	p.o.		0,005 - 0,02			
HYDROCORTISONI HEMISUCCINAS	i.m.	0,002 - 0,008	0,007 - 0,02	0,02 - 0,05	0,05 - 0,1	
HYDROXYZINI DIHYDROCHLORIDUM	p.o.			0,05/den	0,05 - 0,1/den	v dílčích dávkách
	i.m.	1,1 mg				
	p.o.	0,60 mg				preoperační sedace
IBUPROFENUM	p.o.	0,02 (ev. a 0,04)				v dílčích dávkách
		max. 0,5 g				do hmotnosti 30 kg
IMIPRAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	1,5 mg			0,025	6 - 7 let, na noc, léčba enuresis
					0,025 - 0,05	8 - 11 let, na noc, léčba enuresis
					0,05 - 0,075	nad 11 let, na noc, léčba enuresis
INDOMETACINUM	p.o.			0,02 - 0,05/den	0,025 - 0,1/den	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
INSULINUM	s.c.		10 - 50 m.j.			individuálně podle stavu nemocného
IPECACUANHAE RADIX		0,007 - 0,014				6 měsíců - 1 rok
		0,021				starší ne 1 rok
IPRATROPII BROMIDUM	inhal.			20 mg	20 - 40 mg	3x denně
	nebul.				100 - 500 mg	od 3 let, 3x denně
ISONIAZIDUM	p.o., i.m., s.c., i.v.	0,005 - 0,015	0,025 - 0,05	0,06 - 0,1	0,1 - 0,25	nepodávat do 2 měsíců
ISOPRENALINI SULFAS	p.o.			0,005 - 0,01	0,01 - 0,015	
	subling.				0,028	
KALII CHLORIDUM	p.o., i.v.		0,5 - 1,0			individuálně podle stavu nemocného
KALII PERCHLORAS	p.o.			0,1		do 2 let (30 - 60 min před podáním ^{99m}Tc)
	p.o.				0,2	2 - 12 let (30 - 60 min před podáním ^{99m}Tc)
KANAMYCINI MONOSULFAS	i.m., i.v.	0,02				do 1 týdne věku hmotnosti nad 2 kg
	i.m., i.v.	0,015				do 1 týdne věku hmotnosti do 2 kg
	i.m., i.v.	0,015				ostatní
KETOCONAZOLUM	p.o.	0,003 (nebo celkem 0,05)				1 - 4 roky
	p.o.	0,1				5 - 12 let
LACTULOSI SOLUTIO	p.o.		2,5 ml/den	5 ml 2x/den	10 ml 2x/den	do 10 let věku
LANATOSIDUM C	p.o., p.rect.	0,02 - 0,04 mg	0,25 - 0,38 mg	0,38 - 0,65 mg	0,65 - 1,2 mg	saturační denní dávky
	i.v., i.m.	0,008 - 0,016 mg				saturační denní dávky
	p.o.	0,01 - 0,02 mg	0,125 - 0,2 mg	0,2 - 0,32 mg	0,32 - 0,6 mg	udr ovací denní dávky
	i.v.	0,004 - 0,007 mg				udr ovací denní dávky
LEVAMISOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,003				jednorázově

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
LEVOTHYROXINUM NATRICUM	p.o.	25 - 50 mg/den (8 - 10 mg/kg)				do 6 měsíců věku
	p.o.	50 - 75 mg/den (6 - 8 mg/kg)				6 - 12 měsíců věku
	p.o.	75 - 100 mg/den (5 - 6 mg/kg)				1 - 5 let
	p.o.	100 - 150 mg/den (4 - 5 mg/kg)				6 - 12 let
LIDOCAINI HYDROCHLORIDUM	i.v.	3 mg/kg v 0,25 - 0,5 %				regionální i.v. anestezie
	i.v.	0,5 - 1 mg/kg (max. 3 - 5 mg/kg)				antiarytmikum - úvodní dávka
	inf.	10 - 50 mg/kg/min				antiarytmikum - pokračování
LINCOMYCINI HYDROCHLORIDUM MONOHYDRICUM	p.o.	0,03 - 0,06				u starších ne 1 měsíc
	i.m., inf.	0,01 - 0,02				u starších ne 1 měsíc
LINI SEMEN					2,5 - 5,0	
LITHII CARBONAS	p.o.	6 - 8 mg				podle hladina Li v krvi
LOMUSTINUM	p.o.	0,12 - 0,13/m^2				jednorázově
LOPERAMIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,003/den				1. den - 2 - 5 let, v dílčích dávkách
	p.o.	0,004/den				1. den - 5 - 8 let, v dílčích dávkách
	p.o.	0,006 - 0,008/den				1. den - 8 - 12 let, dílčích dávkách
	p.o.	0,001/10 kg				další dny (max. dávka jako 1. den)
LORAZEPAMUM	i.v., p.o.	0,5 - 2,5 mg (50 mg/kg)				5 - 13 let, premedikace
	i.v., p.o.	0,002				status epilepticus
MAGNESII SULFAS	p.o.	a 0,25 /kg/dávku				
	i.m.			0,1/kg		
	i.v.		0,15 - 0,3	0,3 - 0,6	0,6 - 2,0	
MEBENDAZOLUM	p.o.			0,1		starší ne 2 roky, enterobiasis, jednorázově
	p.o.			0,2/den - 3 dny		starší ne 2 roky, ostatní diagnózy
MEPROBAMATUM	p.o.	0,025		0,05 - 0,1	0,1 - 0,3	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
MERCAPTOPURINUM	p.o.	0,0025	0,015 - 0,025/den	0,025 - 0,055/den	0,055 - 0,1/den	
MESTRANOLUM	p.o.				0,05	
METHAQUALONUM	p.o.				0,05 - 0,1	
METHIONINUM	p.o.	0,25				
METHOTREXATUM	intrathec.	0,006				do 1 roku věku
		0,008				1 rok
		0,01				2 roky
		0,012				nad 3 roky
METHYLDOPUM	p.o.	0,01		0,125	0,25	
	i.v.	0,02 - 0,04				
METOCLOPRAMIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,015/den				15 - 19 let, hmotnost 30 - 59 kg (v dílčích dávkách)
	p.o.	0,03/den				15 - 19 let, hmotnost nad 60 kg (v dílčích dávkách)
	p.o.	0,015/den				9 - 14 let, hmotnost nad 30 kg (v dílčích dávkách)
	p.o.	0,0075/den				5 - 9 let, hmotnost 20 - 29 kg (v dílčích dávkách)
	p.o.	0,004 - 0,006/den				3 - 5 let, hmotnost 15 - 19 kg (v dílčích dávkách)
	p.o.	0,002 - 0,003/den				1 - 3 let, hmotnost 10 - 14 kg (v dílčích dávkách)
	p.o.	0,002/den				do 1 roku, hmotnost do 10 kg (v dílčích dávkách)
METRONIDAZOLUM	p.o.			2 x 0,125		2 - 4 roky
				3 x 0,125		4 - 8 let
				2 x 0,25		8 - 15 let
	vagin.				0,5	
MICONAZOLI NITRAS	i.v. inf.	0,02 - 0,04				v infuzi max. 0,015
MICONAZOLUM	p.o.	0,5/den				nad 6 let, ve 4 dílčích dávkách
	p.o.	0,5/den				2 - 6 let, ve 2 dílčích dávkách
	p.o.	0,125/den				do 2 let, ve 2 dílčích dávkách

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
MIDAZOLAMUM		0,15 mg/kg				starší 7 let (úvod do anestezie), v dílčích dávkách
MINOCYCLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,004/kg				úvodní dávka
		0,002/kg				pokračovací dávka, po 2 h
MINOXIDILUM	p.o.	200 mg				úvodní dávka - do 12 let
		lze zvyšovat o 100 mg/kg 3 dny (a do 1 mg/kg = 50 mg/den)				udr ovací dávka
MORPHINI HYDROCHLORIDUM	s.c.	0,1 - 0,2 mg/kg /dávku		0,002 - 0,004	0,004 - 0,01	
NAPHAZOLINI NITRAS	loc.			0,05 - 0,08 mg	0,08 - 0,1 mg	v 0,5 % roztoku na sliznici
NAPROXENUM	p.o.	10 mg				ve 2 dílčích dávkávh
NATRII CALCII EDETAS	i.v., i.m.		0,02/kg	0,04/kg		
NATRII FLUORIDUM	p.o.			0,55 mg		do 2 let
	p.o.			1,1 mg		2 - 3 roky
	p.o.			1,7 mg		3 - 4 roky
	p.o.				2,2 mg	nad 4 roky
NATRII PICOSULFAS	p.o			2,5 - 5 mg	5 - 15 mg	dětem do 5 let nepodávat
NATRII SALICYLAS	p.o., i.v.	0,1 - 0,2	0,1 - 0,25	0,25 - 1,0	1,0 - 2,0	u novorozenců nepodávat
NATRII THIOSULFAS	i.v.		2 - 4/den			
NATRII VALPROAS	p.o.	0,4/den				do 20 kg hmotnosti (v dílčích dávkách)
		0,02 - 0,03				pokračovací dávky
NEOMYCINI SULFAS	p.o.	0,02 - 0,03				novorozenci 0,06 - 0,01 g/den
	p.o.	a 0,04 - 0,1	0,1 - 0,15	0,15 - 0,3	0,3 - 0,8	ostatní děti
	i.m.	0,0075 - 0,015				
	intraperit.			0,25		
NEOSTIGMINI BROMIDUM	p.o.	0,2 mg	0,002 - 0,005	0,005 - 0,01	0,01 - 0,015	
NICETHAMIDUM	p.o.,s.c.,i.m.	0,0065 - 0,02	0,034 - 0,04	0,05 - 0,1	0,1 - 0,25	
NICLOSAMIDUM	p.o.		0,5/den	1,0/den		

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
NICOTINAMIDUM	p.o.,s.c.,i.m.	0,1 - 0,3				
NITRAZEPAMUM	p.o.		1,25 - 2,5 mg	2,5 - 5,0 mg	5,0 mg	
NITROFURANTOINUM	p.o.	0,005 - 0,007	0,017 - 0,02	0,02 - 0,04	0,04 - 0,1	nepodávat kojencům do 3 měsíců věku
NOREPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS	s.c., i.v.	0,01 ml/kg/dávku	0,06 - 0,2 ml	0,2 - 0,3 ml	0,3 - 0,5 ml	1 ml = 1 mg
NORTRIPTYLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.		0,01 - 0,025			2 - 3x denně, ka dý 2. den zvýšit o 10 - 20 mg a do dávky 3x 75 mg/den
	i.m.		0,01			
NYSTATINUM	p.o.	400 tis. m.j./den				ve 4 dílčích dávkách
ORCIPRENALINI SULFAS	p.o.	0,4 mg	0,003 - 0,005	0,005 - 0,008	0,008 - 0,02	
	s.c., i.m.		0,1 - 0,2 mg	0,2 - 0,3 mg	0,3 - 0,5 mg	
	inhal.		0,75 mg/dávku			
ORNIDAZOLUM	p.o.	0,025 v 1 dávce 5 - 10 dní				amébiáza
	p.o., i.v.	0,04				amébová dyzenterie
	i.v.	0,02 - 0,03				amébový jaterní absces
	p.o.	0,04				giardiáza
	p.o.	0,025				trichmoniáza
	i.v.	0,02				anaerobní bakteriální infekce (po 12 h)
OUABAINUM	i.v.	0,01 mg	0,05 - 0,125 mg	0,125 - 0,25 mg	0,25 mg	
OXAZEPAMUM	p.o.		0,005 - 0,01	0,01 - 0,015	0,01 - 0,015	
OXYTETRACYCLINUM	p.o.	0,025 - 0,04	0,009 - 0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4	
		0,01				novorozenci
	i.m.	0,0125	0,011 - 0,03	0,03 - 0,06	0,06 - 0,2	
PANCREATIS PULVIS	p.o.		0,25			

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
PANCURONII BROMIDUM	i.v.	30 - 40m/kg				novorozenci - úvodní dávka
	i.v.	10 - 20 mg/kg				novorozenci - pokračovací dávka
	i.v.	40 - 100 mg/kg				ostatní - úvodní dávka
	i.v.	10 - 20 mg/kg				ostatní - pokračovací dávka
PAPAVERINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,004	0,001 - 0,015	0,015 - 0,03	0,03 - 0,08	
	s.c.	2,4 mg	0,007 - 0,01	0,01 - 0,02	0,03 - 0,04	
PARACETAMOLUM	p.o.		0,06 - 0,12	0,12 - 0,25	0,25 - 0,5	
	p. rect			0,125		1 - 4x denně
PENICILLAMINUM	p.o.	0,03 - 0,04	0,25 - 0,6	0,6 - 1,5	1,5 - 2,0	
PENTOBARBITALUM NATRICUM	p.o.,i.m.,i.v.	0,001 - 0,002				sedativum
		0,002 - 0,004				hypnotikum
PERPHENAZINUM	p.o.		0,008 - 0,016			2 - 4x denně
PETHIDINI HYDROCHLORIDUM	p.o., i.m., s.c., i.v.	0,001 - 0,002		0,005 - 0,01	0,01 - 0,03	
PHENACETINUM	p.o.			0,01 - 0,2	0,2 - 0,5	
PHENOBARBITALUM	p.o.	0,006				
PHENOBARBITALUM NATRICUM	s.c., i.m.	0,003 - 0,005/dávku				
PHENOXYMETHYLPENICILLINUM KALICUM	p.o.	25 tis. - 50 tis. m.j.	80 tis. - 100 tis. m.j.	100 tis. - 250 tis. m.j.	250 tis. - 600 tis. m.j	
PHENTOLAMINI MESILAS	i.v.		0,001 - 0,005 g			
PHENYLEPHRINI HYDROCHLORIDUM	s.c., i.m.	100 mg/kg				
PHENYTOINUM NATRICUM	p.o.	0,003 - 0,008	0,01 - 0,03	0,03 - 0,05	0,05 - 0,1	
PHOLCODINUM	p.o.			0,002 - 0,0025 mg	0,0025 - 0,005 mg	do 5 let 3x denně, nad 5 let 4 x denně
PHTHALYLSULFATHIAZOLUM	p.o.	0,2	0,2 - 0,5	0,5 - 1,0	1,0 - 2,0	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
PHYTOMENADIONUM	p.o.		0,002 - 0,003	0,003 - 0,005	0,005 - 0,01	
	i.m.		0,001 - 0,0025	0,0025 - 0,005	0,005 - 0,01	
PIPERAZINI ADIPAS	p.o.	0,04 - 0,06	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4	0,4 - 0,6	
PIPERAZINI CITRAS	p.o.	0,12/kg (max. 4 g)				škrkavka
	p.o.	50 - 75 mg/kg/den				roup (do 2 let)
	p.o.	0,75/den - 7 dní				roup (2 - 4 roky)
	p.o.	1,5/den - 7 dní				roup (5 - 12 let)
	p.o.	2,0/den - 7 dní				roup (starší 12 let)
PIROXICAMUM	p.o.	0,005/den				do 15 kg
		0,01/den				do 16 - 25 kg (starší 6 let)
		0,015/den				do 26 - 45 kg
		0,02/den				nad 45 kg
PRAZOSINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,003/den				od 12 let
PREDNISONUM	p.o.	0,001 - 0,002	0,002 - 0,005	0,005 - 0,01	0,01 - 0,025	
	p.o.		0,003 - 0,004/kg/den	0,002 - 0,003/kg/den	0,0015 - 0,002/kg/den	nárazová a úvodní dávka
	p.o.		0,3 - 1,5 mg/kg/den	1 mg/kg/den	0,2 - 0,6 mg/kg/den	udr ovací dávka
PRIMAQUINI DIPHOSPHAS	p.o.	200 - 300 mg/kg/den - 14 dní				
PROBENECIDUM		0,025/kg				Starší 2 let a do hmotnosti 50 kg (úvodní dávka)
		0,01/kg á 6 h				udr ovací dávka
PROCAINAMIDI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,005 - 0,01/kg/dávka		0,05 - 0,09	0,09 - 0,25	
	i.v.		0,014 - 0,02	0,02 - 0,04	0,04 - 0,1	
PROCAINI BENZYLPENICILLINUM	i.m.	50 000 m.j.	60 tis. - 100 tis. m.j.	100 tis - 200 tis. m.j.	200 tis. - 600 tis. m.j.	

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
PROCAINI HYDROCHLORIDUM	s.c., i.m.		0,003 - 0,005/kg			jednorázově
	i.v.		0,003 - 0,005/kg během 1 h			jednorázově v 0,5 - 1,0% roztoku
PROCHLORPERAZINI HYDROGENOMALEAS	p.o.		250 mg/kg			3x denně, nepodávat při hmotnosti do 10 kg
PROMETHAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.,i.m.,i.v.	0,001 - 0,002	0,002 - 0,005	0,005 - 0,01	0,01 - ,025	
PROPRANOLOLI HYDROCHLORIDUM	p.o.			0,01 - 0,03	0,01 - 0,03	
	i.v.			0,001 - 0,003	0,001 - 0,003	
PROPYLTHIOURACILUM	p.o.	0,05 - 0,15/den				6 - 10 let
	p.o.	0,15 - 0,3/den				nad 10 let
PYRAZINAMIDUM	p.o.	0,035 (max. 3 g)				
		nebo 0,05 - 3x týdně				
		nebo 0,75 - 2x týdně				
PYRIDOXINI HYDROCHLORIDUM	p.o.		0,01 - 0,05			
	i.m., i.v.		0,01 - 0,05			
PYRIMETHAMINUM	p.o.	1,25 mg/kg max. 1x týdně				od 2 měsíců
QUININI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,03				ve 3 dílčích dávkách
RIBOFLAVINUM	p.o.		0,01 - 0,03	0,01 - 0,03	0,01 - 0,03	
	i.m.		0,01	0,01	0,01	
RIFAMPICINUM	p.o.	0,01 - 0,02				max. 0,6/den
RIFAMYCINUM NATRICUM	p.o.	0,01 (max. 0,9 g)				
ROXITHROMYCINUM	p.o.	0,005 - 0,01 g				
SALBUTAMOLUM	inhal.	0,3 - 0,8 mg/den				ve 3 - 4 dílčích dávkách
	p.o.			0,001 - 0,002	0,002	3 - 4x denně

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
SCOPOLAMINI HYDROBROMIDUM	p.o.	75 - 150 mg				4 - 10 let
	p.o.	150 - 300 mg				nad 10 let
SENNAE FOLIUM	p.o.				0,0075 - 0,015	
SOMATROPINUM	i.m.	0,8 m.j./kg nebo 20 m.j./m^2 ve 3 dávkách/týden				
	s.c.	0,8 m.j./kg nebo 20 m.j./m^2 v 6 - 7 dávkách/týden				
SPIRAMYCINUM	p.o.	0,05				v dílčích dávkách
SPIRONOLACTONUM	p.o.	0,0015 - 0,003	0,004 - 0,006	0,006 - 0,011	0,011 - 0,02	
STREPTOKINASUM	i.v.	1300 - 1400 m.j/kg/h				
STREPTOMYCINI SULFAS	i.m.	0,01 - 0,02				novorozenci
	i.m.	0,03				kojenci a starší děti
	p.rect., intraperit.	0,001				
	intrapleur.	0,05/ml				
	intraartic.		0,025 - 0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,5	
SULFADIAZINUM	p.o.	0,075/kg				úvodní dávka
		0,15 (max. 6,0/den)				pokračovací dávka, ve 4 dílčích dávkách
	i.v.	0,05/kg				úvodní dávka (starší 2 měsíce)
		0,1				pokračovací dávka (starší 2 měsíce) ve 4 dílčích dávkách
SULFADIMIDINUM	p.o.	0,1 - 0,15	0,5	0,5 - 1,0	1,0 - 2,0	
	i.m.	0,5				
SULFADOXINUM	p.o.	0,025				starší 2 měsíce
SULFAFURAZOLUM	p.o.	0,18	1,0 - 1,5/den	2,0 - 2,75/den	3,0 - 5,0/den	
	i.v.	0,1				

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
SULFAMETHIZOLUM	p.o.	0,03 - 0,045				ve 4 dílčích dávkách
SULFAMETHOXAZOLUM	p.o.	0,05 - 0,06				úvodní dávka
		0,05 - 0,06 (max. 0,075/kg)				pokračovací dávka (ve 2 dílčích dávkách)
SULFASALAZINUM	p.o.	0,04 - 0,06				úvodní dávka
		0,02 - 0,03				v remisi
SUXAMETHONII CHLORIDUM	i.v.	0,002				
TEMAZEPAMUM	p.o.	0,001				
TERBUTALINI SULFAS	inhal.	1,25 - 2,5 mg				do hmotnosti 25 kg
	inhal.	2,5 - 5,0 mg				nad hmotnost 25 kg, ve 3 dílčích dávkách
	p.o.	75 mg/kg				
	s.c.	10 mg/kg (max 300 mg)				starší 2 let
TERFENADINUM	p.o.				0,03	2x denně
TETRACOSACTIDUM	i.v.	250 mg/1,73 m^2				
	i.m.	250 mg á 2 - 8 dní				1 měsíc - 2 roky věku
		250 - 500 mg				2 - 5 let
		250 mg - 1 mg				5 - 12 let
TETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,025 - 0,05				starší děti
	i.v., inf.	0,01 - 0,02				v 1 dávce i.m. max. 250 mg
THEOPHYLLINUM	p.o.	0,01	0,025	0,025 - 0,05	0,05 - 0,13	
THIAMINI HYDROCHLORIDUM	p.o., i.m.		0,0125 - 0,025			
THIAMPHENICOLUM	p.o.,i.m.,i.v	0,03 - 0,1				
THIORIDAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,0015		0,02 - 0,03/den	0,03 - 0,075/den	
TICARCILLINUM NATRICUM	i.v.	0,2 - 0,3				
	p.o.	0,05 - 0,75				v dílčích dávkách
TINIDAZOLUM	p.o.	0,05 - 0,75				jednorázově
TOCOFEROLI ALFA ACETAS	p.o.		0,005 - 0,01	0,01 - 0,05	0,05 - 0,1	
TRIAMCINOLONUM	p.o.		0,5 - 1 mg	2 - 3 mg	3 - 4 mg	
TRIAMTERENUM	p.o.	0,002 - 0,004				v dílčích dávkách

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
TRIFLUOPERAZINI HYDROCHLORIDUM	p.o.	0,001 - 0,002/den				psychóza
	i.m.	50 mg/kg/den				akutní psychóza, v dílčích dávkách
	p.o.	0,001/den				antiemetikum (3 - 5 let), v dílčích dávkách
	p.o.	max 0,004/den				antiemetikum (6 - 12 let), v dílčích dávkách
TRIMETHADIONUM	p.o.	0,02 - 0,04		0,15 - 0,3	0,3 - 0,6	
TRIMETHOPRIMUM	p.o.	0,05/den				6 týdnů - 5 měsíců věku
		0,1/den				6 měsíců - 5 let
		0,2/den				6 - 12 let
		0,025/noc				dlouhodobá profylaxe (6 měsíců - 5 let)
		0,05/noc				dlouhodobá profylaxe (6 - 12 let)
TUBOCURARINI CHLORIDUM	i.v.	300 - 500 mg/kg				
	i.v.	200 - 250 mg/kg				nedonošení novorozenci
UREA	i.v.	1,0 - 1,5				
VANCOMYCINI HYDROCHLORIDUM	i.v.	0,04				ve 4 dílčích dávkách
		0,015				úvodní dávka - novorozenci (1. týden ivota)
		0,02				pokračování - novorozenci (1. týden ivota) - ve 2 dílčích dávkách
		0,03				pokračování - novorozenci (2., 3., 4. týden ivota) - ve 3 dílčích dávkách
VERAPAMILI HYDROCHLORIDUM	i.v.	0,75 - 1 mg				novorozenci
	i.v.	0,75 - 2 mg				do 1 roku
	i.v.	2 - 3 mg				1 - 5 let
	i.v.	2,5 - 5 mg				6 - 15 let
	p.o.	0,04 - 0,06/den				do 2 let, v dílčích dávkách
	p.o.	0,08 - 0,36/den				od 2 let, v dílčích dávkách

Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti

Název	Způsob podání	Dávkování (g)*				Poznámka
			Jednotlivá terapeutická dávka podle věku*			
		g kg den*	rok	let	let	
VINBLASTINI SULFAS	i.v.		schéma týdenní dávky			
		0,1 - 0,2 mg/kg/týden	0,025 mg/kg v jedné dávce 1. týden			
			0,05 mg/kg v jedné dávce 2. týden			
			0,075 mg/kg v jedné dávce 3.týden			
			a do 0,15 - 0,2 mg/kg			
VINCRISTINI SULFAS	i.v.		schéma týdenní dávky			
		0,05 - 0,15 mg/kg/týden	0,05 mg/kg v jedné dávce 1. týden			
			0,075 mg/kg v jedné dávce 2. týden			
			0,1 mg/kg v jedné dávce 3. týden			
			a do 0,15 mg/kg			
VITAMINUM A	p.o.	100 000 m.j.	léčba xeroftalmie (do 1 roku věku)			
	i.m.	50 000 m.j.	léčba xeroftalmie (do 1 roku věku)			
	p.o.	200 000 m.j.	léčba xeroftalmie (ostatní)			
	i.m.	100 000 m.j.	léčba xeroftalmie (ostatní)			
	p.o.	100 000 m.j. á 3 - 6 měsíců	profylaxe xeroftalmie (do 1 roku věku)			
	p.o.	200 000 m.j. á 3 - 6 měsíců	profylaxe xeroftalmie (ostatní)			
XANTINOLI NICOTINAS	p.o.		0,15 - 0,6			3x denně
	i.m., i.v.		0,3 - 0,6			1 - 3x denně
XYLOMETAZOLINI HYDROCHLORIDUM	intranas.	1 - 2 gtt. do ka dé nosní dírky				od 3 měsíců věku , 0,05% roztok do ka dé nosní dírky
ZIDOVUDINUM	p.o.	0,48 - 0,96/m^2				ve 4 dílčích dávkách
	i.v.	0,9 - 1,4 mg/kg/h				

není-li uvedeno jinak

Tabulka VI: Doporučené dávky některých oficinálních léčiv používaných u zvířat

N

Dávky jsou vyjádřeny v gramech, pokud není uvedeno jinak, a to buď jako obecné pro jednotku živé hmotnosti (popř. na m^2 plochy povrchu těla), nebo pro jednotlivé živočišné druhy nebo pro jednotlivé zvíře, vždy pro jednotku hmotnosti. V těchto případech je počítáno u koně (*equus*, E) a skotu (*bos*, B) s živou hmotností dospělého zvířete kolem 500 kg, u prasete (*sus*, S) se 100 kg, u ovce (*ovis*, O) a kozy (*capra*, Cp) s 50 kg, u psa (*canis*, C) s 20 kg, u kočky (*felis*, F) se 2 kg a u kura (gallus, G) se 2 kg živé hmotnosti (ž.hm.). Pro zvířata těžší bývá dávka většiny léčiv přepočtená na kg hmotnosti nižší, u zvířat lehčích (zpravidla mladých) vyšší. Při stanovení dávky léčiva pro jedince těžší a lehčí, než jsou výše uvedené hmotnosti, lze vyjít i z poměrů plochy povrchu těla dospělého jedince a jedince těžšího či lehčího, čímž se dávky pro odlišně těžká zvířata stejného druhu korigují v uvedeném smyslu přímo. Výpočet plochy povrchu těla je možný podle vztahu:

$$A = \mathrm{K} \,.\, m^{2/3},$$

v němž značí:
A - plochu povrchu těla v cm^2,
K - konstantu pro daný živočišný druh,
m - hmotnost v g.

K výpočtům lze použít zjednodušené tabelární hodnoty K, a to pro E = 9,5; B = 9,0; S = 9,0; O = 9,0; F = 10; C (do 5 kg ž.hm.) = 10,0 a C (nad 5 kg ž.hm.) = 11,0. Podle poměru vypočítané plochy povrchu těla dospělého jedince, pro kterého je stanovena základní dávka, a vypočítané plochy povrchu těla jedince odlišně těžkého se pak upraví příslušná dávka.

Uváděné dávky jsou dávky jednorázové, popř. jednotlivé denní, pokud není uvedeno jinak (např. rozdělení denní dávky nebo podání jednotlivé dávky opakovaně během dne).

Poznámka: Seznam zkratek použitých v tabulce - viz *Tabulka IV: Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé* (str. 722).

ACETAZOLAMIDUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika, antiglaukomatika
Dávky:

p.o.	obecně: 1-3 $mg.kg^{-1}$
i.m.	obecně: 1 $mg.kg^{-1}$
p.o.	C, F: 5-10 $mg.kg^{-1}$, jako antiglaukomatikum 6-8 h

ACIDUM ACETYLSALICYLICUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika, antipyretika
Dávky:

p.o.	E: 30-50 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
	B: 75-100 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
	O, Cp: 40-80 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h (d.pro die až 15,0)
	S: 10 $mg.kg^{-1}$ každých 6 h (d.pro die až 7,0)
	C: 25-30 $mg.kg^{-1}$ každých 8 h (d.max.p.d. 3,0)
	F: 25-50 $mg.kg^{-1}$ každých 24-48 h (d.max.s. 50 $mg.kg^{-1}$)
	G: 100 $mg.kg^{-1}$

ACIDUM ASCORBICUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu C
Dávky:

p.o.	E: až 10,0; S: 2,0-3,0; malá zvířata: 0,2-0,3
	(také obecně savci: 30-90 $mg.kg^{-1}$)
	G: 60-150 $mg.kg^{-1}$ (0,75 na kg krmiva)
	Cizokrajní ptáci: 0,15-0,3 na litr pitné vody
	Morče: až 1,0 na litr pitné vody
	(Preventivní dávky jsou 2-3x nižší.)
i.v. (nárazové dávky)	E, B: 10,0-20,0
i.v., i.m., (s.c.)	S: 0,3-1,0; C: 0,2-0,5
s.c	C: 0,1 (opakovaně)

ACIDUM ETACRYNICUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika (akutní edémy)
Dávky: i.v., p.o. obecně: 0,3-3 $mg.kg^{-1}$

ACIDUM HYDROCHLORICUM 10%
Farmakologická skupina, použití: acida, stomachika, ruminatoria
Dávky:

p.o.	v pitné vodě 3x denně
	E: 20 ml; B: 30 ml; O, Cp: 5 ml; S: 3 ml; C: 0,5 ml; F: 0,2 ml; G: 0,5 ml

ACIDUM LACTICUM
Farmakologická skupina, použití: pomocné látky, dezinficiencia ran a porodních cest (koncentrace do 1 %), prostorová dezinficiencia (až 50 $mg.m^{-3}$), ruminatoria a antiseptika gastrointestinálního traktu (koncentrace 1-5 % až i 7,5 %)
Dávky: p.o. E: 5,0-15,0; B: 8,0-15,0; O, Cp: 1,0-3,0; S: 0,5-3,0; C: 0,2-1,0; F: 1,0; G: 0,2

ACIDUM PHOSPHORICUM 10%
Farmakologická skupina, použití: acida
Dávky: p.o. v pitné vodě: E: 20,0; B: 30,0; O, Cp, S: 5,0; C: 0,5; F: 0,2; G: 0,3

ALGELDRATUM
Farmakologická skupina, použití: antacida
Dávky: p.o. B: 15,0-30,0; O: 1,0-2,0; C: 10 $mg.kg^{-1}$

ALOE CAPENSIS
Farmakologická skupina, použití: laxativa pro koně
Dávky:

p.o.	E: kolem 30,0 (d.maxima 45,0)
	[B: 60,0; O, Cp: 15,0; S: 10,0; C: 5,0; F: 1,0; G: 0,5]

AMFETAMINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: psychostimulancia, centrální analeptika, nervová stimulancia
Dávky:

s.c., i.m.	Malá zvířata: kolem 0,5 $mg.kg^{-1}$
p.o.	C, F: 0,0025
	Velká zvířata: nepoužívá se samotný - orientačně přibližně 0,2-0,4 $mg.kg^{-1}$

AMILORIDI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky: p.o. C: event. 0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$ (dosis toxica - 2 $mg.kg^{-1}$)

AMINOPHENAZONUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika, antipyretika
Dávky: p.o. E, B: 10,0-20,0; O, Cp: 5,0-10,0; S: 1,0-10,0; C: 0,5-4,0; F: 0,05-0,5

AMINOPHYLLINUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky:

p.o.	(každých 8-12 h, event. i jednou za 24 h)
	E, B: 5,0-10,0; O, Cp, S: 1,0-2,0; C: 0,1-0,5; F: 0,1
i.v.	obecně 5-6 $mg.kg^{-1}$

AMMONII CHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: soli a ionty k perorálnímu a parenterálnímu použití, sekretolytika, diuretika
Dávky:

p.o.	E, B: 10,0-15,0; O, Cp: 2,0-5,0; S: 1,0-2,0
	C: kolem 0,5; F: kolem 0,2 (sekretolytika)
	E: kolem 10,0; B: kolem 15,0; O, Cp: kolem 3,0
	S: kolem 1,5; C: kolem 0,6; F: kolem 0,2 (diuretika)

AMOXICILLINUM TRIHYDRICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

i.m.	B, O, S: 15 $mg.kg^{-1}$
s.c., i.m.	C, F: 15 $mg.kg^{-1}$

AMPICILLINUM, AMPICILLINUM TRIHYDRICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	obecně (kromě přežvýkavců): 4-12 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
	C: 35 $mg.kg^{-1}$ (také 10-40 $mg.kg^{-1}$) každých 8-12 h
	F: 20-60 $mg.kg^{-1}$ každých 8-12 h

AMPICILLINUM NATRICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

i.m.	E: 8 $mg.kg^{-1}$ každých 8 h
	B: 4-10 $mg.kg^{-1}$
	F: až 20 $mg.kg^{-1}$ každých 6-8 h,
i.m., i.v., s.c.	Tele: 5-12 $mg.kg^{-1}$ každých 6 h
	C: 8 $mg.kg^{-1}$ každé 4 h, resp. až 20 $mg.kg^{-1}$ každých 8 h

APOMORPHINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: emetika (proti alotriofagii)
Dávky:

s.c.	C: 0,08-0,4 $mg.kg^{-1}$ (d.max. 10 mg pro toto)
	S: 0,01-0,1 $mg.kg^{-1}$ (d.max. 0,04 pro toto)
	F: 0,02 až 0,05 pro toto (d.max.: 0,4 pro toto)
	(d.max. pro toto E: 0,05; B: 0,1; O, Cp: 0,02)
i.m.	C: 0,03 $mg.kg^{-1}$

ARGENTI NITRAS
Farmakologická skupina, použití: antiseptika, adstringencia, obstipancia
Dávky:

p.o.	(silně zředěn vodou, lépe PIL s Bolus alba a glycerolem)
	E, B: 2,0; O, Cp, S: 0,3; C: 0,05; F, G: 0,01

ATROPINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: spasmolytika, antiemetika, antidota při otravě organofosfáty
Dávky:

i.m., s.c.	obecně: 0,05-0,1 $mg.kg^{-1}$, jako antidotum: 0,5 $mg.kg^{-1}$
	E, B: 0,03-0,05 (d.max.: 0,1 pro toto)
	O, Cp, S: až 0,03
	C: 0,002-0,005 (až 0,03; antiemetikum 0,02 $mg.kg^{-1}$)
	F: až 0,003-0,005 (antiemetikum 0,02 $mg.kg^{-1}$)
i.v., i.m.	antidotum (opakovaně)
	E: 0,1 $mg.kg^{-1}$; B: 0,6 $mg.kg^{-1}$; O: 1 $mg.kg^{-1}$
	C: 0,3 $mg.kg^{-1}$

BARBITALUM
Farmakologická skupina, použití: sedativum
Dávky: p.o. C: 1,0 (u těžších až 1,5)

BELLADONNAE FOLIUM
Farmakologická skupina, použití: spasmolytika
Dávky: p.o. E, B: 40,0; O, Cp: 12,0; S: 10,0; C: 1,0

BENDROFLUMETHIAZIDUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky: i.m., s.c., p.o. obecně: 0,1-0,2 $mg.kg^{-1}$ (d.pro die)

BENZATHINI BENZYLPENICILLINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

i.m., s.c.	E: 15 000-20 000 m.j./kg ž.hm. (1x pro kura)
	B: 6000 (také až 20 000) m.j./kg ž.hm. (1x pro kura)
	Tele: 25 000-30 000 m.j./kg ž.hm. (1x pro kura)
	C: 15 000-30 000 m.j./kg ž.hm. (1x pro kura)
	O: 8000 m.j./kg ž.hm. (každých 48-72 h)
	S: 10 000-40 000 m.j./kg ž.hm. (každých 48-60 h)
intramam.	
do 1 čtvrti	B: 100 000-300 000 m.j. (event. opakovat za 24 h);
	také 600 000 m.j. (jednorázově)

BENZOCAINUM
Farmakologická skupina, použití: lokální anestetika, antiemetika
Dávky: p.o. C: 0,2-0,5 (1-3x denně)

BENZYLPENICILLINUM KALICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

i.m.	E: 15 000-25 000 m.j./kg ž.hm. každých 6 h
	B: 10 000-30 000 m.j./kg ž.hm. každých 8 h
	O, Cp: 15 000-45 000 m.j./kg ž.hm. každých 8 h
	S: 20 000 m.j./kg ž.hm. každých 8 h
	C: 10 000-30 000 m.j./kg ž.hm. každých 6 h
	F: 20 000 m.j./kg ž.hm. každých 6 h
p.o.	G: 7500-10 000 m.j./kg ž.hm.
intramam.	B: 100 000-500 000 m.j.
intraartic.	E: 300 000-600 000 m.j.

BROMHEXINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: expektorancia
Dávky:

i.m.	E, B: 0,15 $mg.kg^{-1}$; C, F: 0,5 $mg.kg^{-1}$
p.o.	E, B: 0,3 $mg.kg^{-1}$; C, F: 1 $mg.kg^{-1}$
i.m., p.o.	S: 0,3 $mg.kg^{-1}$; tele, sele: 0,5 $mg.kg^{-1}$

BUSULFANUM
Farmakologická skupina, použití: cytostatika, chronické myeloidní leukemie
Dávky: p.o. C: 0,5-6 mg pro toto (nárazová, udržovací: 0,16-2 mg)

CALCII CARBONAS
Farmakologická skupina, použití: antacida
Dávky: p.o. B: 60,0-300,0; O: 10,0-20,0; C: 50-100 $mg.kg^{-1}$

CALCII CHLORIDUM HEXAHYDRICUM
Farmakologická skupina, použití: soli a ionty k perorálnímu a parenterálnímu použití, kalcioterapie
Dávky:
i.v. (přísně) v 5-10% roztoku obecně: 20-50 $mg.kg^{-1}$
E: až 25,0; B: až 35,0; O, Cp: až 2,0; S, C: až 1,5

CALCII GLUCONAS
Farmakologická skupina, použití: soli a ionty k perorálnímu a parenterálnímu použití, kalcioterapie
Dávky:
i.v. (část i.m., s.c.) ve 2-10% roztoku obecně: 100 $mg.kg^{-1}$
E, B: 50,0; O, Cp: 5,0; S: 10,0; C: 2,0; F: 0,2-1,0

CAMPHORA RACEMICA
Farmakologická skupina, použití: derivancia, analeptika centrální
Dávky:
p.o. C: 1,4; F: 0,2; G: 0,2
Pro pach mléka, masa nevhodný u E, B (15,0), O, Cp, S (3,0)

CARBO ACTIVATUS
Farmakologická skupina, použití: adsorbencia, obstipancia, antidota
Dávky:
p.o. ve vodě rozděleně pro die (jako antidotum najednou)
E, B: až 600,0; O, Cp, S: až 150,0; C: až 20,0-50,0

CEFADROXILUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Zákaz použití u zvířat určených k produkci potravin!
Dávky: p.o. obecně: 10-20 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h

CEFALEXINUM MONOHYDRICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky: p.o. C: 25 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h

CHLORALI HYDRAS
Farmakologická skupina, použití: hypnotika, sedativa
Dávky:
i.v. přísně (v 5-10-20% roztoku) E: 1,0 na 10 kg ž.hm.
(k narkóze 10% roztok 1,2-1,4 na 10 kg ž.hm.)
B: až 0,8 na 10 kg ž.hm.; O, Cp: 0,7 na 10 kg ž.hm.
S: 100 $mg.kg^{-1}$; C: 1,3 na 10 kg ž.hm.
i.p. Sele: 300 $mg.kg^{-1}$ ve 4% roztoku
p.o. E, B: 1,0 na 10 kg ž.hm.; O, Cp, S: 10,0
C: 300 $mg.kg^{-1}$; F: 200 $mg.kg^{-1}$
p.rect. E, B: 1,2-1,5 na 10 kg ž.hm.

CHLORAMPHENICOLI NATRII SUCCINAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Zákaz použití u zvířat určených k produkci potravin!
Dávky:

i.m.	obecně (kromě F): 10-20 $mg.kg^{-1}$ 1x denně
	F: 15-25 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h

CHLORAMPHENICOLUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Zákaz použití u zvířat určených k produkci potravin!
Dávky:

p.o.	obecně (kromě F): 0,5 na 10 kg ž.hm. každých 8 h
	C: 30-50 $mg.kg^{-1}$ každých 4-6 h; F: 20 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
i.m.	(každých 12 h) E: 6/12/15 $mg.kg^{-1}$; C, F: 25-30 $mg.kg^{-1}$

CHLORPROMAZINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antipsychotika
Dávky:

p.o.	(ke zklidnění) B: 5 $mg.kg^{-1}$; C: 0,1
	(antiemetikum) C, F: 3-4 $mg.kg^{-1}$
i.m.	B, S: 1-2 $mg.kg^{-1}$ (pro E není vhodný); O, Cp: až 4 $mg.kg^{-1}$
	C: 2,5-5 $mg.kg^{-1}$ (antiemetikum 0,5 $mg.kg^{-1}$); F: 2-5 $mg.kg^{-1}$
i.v. (zvolna)	C: 1-3 $mg.kg^{-1}$ (0,1 na 30 kg ž.hm.)

CHLORPROTHIXENI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antipsychotika
Dávky:

i.m., i.v.	S: 0,3-1 $mg.kg^{-1}$
	C: 2-4 $mg.kg^{-1}$ (i.m. i 3-6 $mg.kg^{-1}$)
i.v.	O, Cp: 0,5 $mg.kg^{-1}$
	E: 0,75-1 $mg.kg^{-1}$ (k premedikaci)

CHLORTETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	obecně (kromě přežvýkavců): 0,1-0,2 na 10 kg ž.hm. každých 6-12 h
	E, hříbě, tele, S: 0,1-0,25 na 10 kg ž.hm. každých 12 h
	C, F: 25-50 $mg.kg^{-1}$ každých 8-12 h
i.m.	S: 5-8 $mg.kg^{-1}$; tele: 15 $mg.kg^{-1}$
	Malá zvířata: 10-20 $mg.kg^{-1}$
i.v.	(1% roztok) obecně: 10 $mg.kg^{-1}$; C: 10 $mg.kg^{-1}$

CIMETIDINUM
Farmakologická skupina, použití: antihistaminika, antacida
Dávky:

p.o.	C: 5-10 $mg.kg^{-1}$ každých 6-8 h
	F: 2,5 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
i.v.	C: 5 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h

COCAINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: (lokální) anestetika
Dávky: k povrchové anestezii ve 2-4% roztoku E: 0,5; B: 0,6; C: 0,025 na 10 kg ž.hm.

CODEINI HYDROGENOPHOSPHAS SESQUIHYDRICUS
Farmakologická skupina, použití: antitusika
Dávky:

p.o.	(opakovaně každých 6-8 h)
	E, B: až 4 $mg.kg^{-1}$ (pro E d.max.p.d. 5,0)
	S: až 1 $mg.kg^{-1}$ (d.max.p.d. 0,5)
	O, Cp: 0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$
	C: 1-2 $mg.kg^{-1}$ (d.max.p.d. 0,3)
	F: 0,25-4 $mg.kg^{-1}$ (d.max.p.d. 0,03)
s.c.	E: 0,5 (opakovaně do 2,0 d.pro die)
	C: 0,03 (opakovaně do 0,2 d.pro die)

CODEINUM
Farmakologická skupina, použití: antitusika
Dávky:

p.o.	(každých 6-8 h) E, B: až 4 $mg.kg^{-1}$; S: až 1 $mg.kg^{-1}$
	C: 1-2 $mg.kg^{-1}$; F: 0,25-4 $mg.kg^{-1}$

COFFEINUM
Farmakologická skupina, použití: analeptika; kardiotonika
Dávky:

p.o.	E, B: 5,0-10,0 (D.L. 200 $mg.kg^{-1}$, resp. 100,0)
	O, Cp, S: 0,5-3,0 (D.L. 300 $mg.kg^{-1}$, resp. 10,0)
	C: 0,1-0,5 (D.L. 500 $mg.kg^{-1}$, resp. 5,0)
	F: 0,05-0,2

COLECALCIFEROLUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu D
Dávky:

p.o.	(jednorázově) E, B: 200-400 m.j./kg ž.hm.
	O, Cp: 160-400 m.j./kg ž.hm.
	S: 300-500 m.j./kg ž.hm.
	C: 100-500 m.j./kg ž.hm.
	(denně po 7 d) G: 120-360 m.j./kg ž.hm.
	Krocan: 1000 m.j./kg ž.hm.
i.m.	(jednorázově) kráva: 500 000-1 000 000 mj. (k profylaxi poporodní parézy týden před otelením - 10 000 000 m.j.)
	jalovice: 250 000-500 000 m.j., tele: 50 000-250 000 m.j.
	O, Cp, S: 300 000-500 000 m.j.; C: 100 000-300 000 m.j.

COLISTINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	(každých 12 h) tele, S: 2,5 $mg.kg^{-1}$, G: 3 $mg.kg^{-1}$
	(každých 8 h) C, F: 2,5 $mg.kg^{-1}$
i.m.	(jednou denně) B, tele, S, sele: 3 $mg.kg^{-1}$

CYANOCOBALAMINUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu B_{12}
Dávky:

i.m., s.c.	obecně: 1,5-3 $\mu g.kg^{-1}$
	E, B: až 0,002

CYCLOPHOSPHAMIDUM
Farmakologická skupina, použití: cytostatika, leukemie
Dávky:

p.o.	C: 50 $mg.m^{-2}$ (obden po 4-6 týdnů)
	F: 0,3-2,5 $mg.kg^{-1}$ denně (podle stavu leukocytů)

DEFEROXAMINI MESILAS
Farmakologická skupina, použití: antidota (při otravě železem)
Dávky:

p.o.	obecně: 100 $mg.kg^{-1}$
i.m.	obecně: až 50 $mg.kg^{-1}$

DEXAMETHASONI ACETAS
DEXAMETHASONI NATRII PHOSPHAS
DEXAMETHASONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (glukokortikoidy)
Dávky:

i.v. (zvolna)	obecně 2-5 $mg.kg^{-1}$ při šoku (opakovat za 8-12h)
i.v., i.m.	E, B, S: 0,02-0,08 $mg.kg^{-1}$; C, F: 0,1-0,25 $mg.kg^{-1}$
i.m.	E: 0,02-0,05; B: 0,02; S: 0,002-0,005; C, F: 0,000125-0,001
p.o.	E, B: 0,02; C: 0,025-0,05 $mg.kg^{-1}$ (každých 8-12 h)
	F: 0,125-0,5 $mg.kg^{-1}$ (jednou denně)
intraartic.	0,4-2 mg, resp. 4-8 mg na jeden kloub

DIAZEPAMUM
Farmakologická skupina, použití: anxiolytika, antineurotika, antikonvulziva
Dávky:

p.o.	Tele do 14 dnů stáří: 3 mg/10 kg ž.hm.; starší: 10 mg/10 kg ž.hm.
	Býček: 3 $mg.kg^{-1}$
	Jalovice, S: 1,5-2,1 $mg.kg^{-1}$
	C: až 0,005; F: až 0,005 (při křečích 3x denně)
s.c., i.m.	C: 0,05-0,25 $mg.kg^{-1}$ (ke zklidnění, zvýšení apetitu)
	C: 1 $mg.kg^{-1}$ (k premedikaci narkózy)
i.m.	S: 5-8 $mg.kg^{-1}$
i.v.	B: 0,5 $mg.kg^{-1}$
i.v., i.m.	(sodná sůl) při křečích
	C: 0,035; F: až 0,01

DIGITALIS PURPUREAE FOLIUM
Farmakologická skupina, použití: kardiotonika
Dávky: p.o. E, B: 10,0; O, Cp, S: 1,0; C: 0,4; F: 0,1

DIGITOXINUM
Farmakologická skupina, použití: kardiotonika
Dávky:

p.o.	E: nárazová 1,5-3 mg/50 kg ž.hm., udržovací 0,2-0,3 mg/50 kg ž.hm.
	C: nárazová 0,1-0,2 $mg.kg^{-1}$, udržovací 0,01-0,1 $mg.kg^{-1}$, 2x denně
	F: 0,03-0,06 $mg.kg^{-1}$, 1x denně (bez nárazové dávky)

DIGOXINUM
Farmakologická skupina, použití: kardiotonika
Dávky:

p.o.	E: nárazová až 3 mg/50 kg ž.hm., udržovací 0,1-0,3 mg/50 kg ž.hm.
	C: nárazová 0,05-0,2 $mg.kg^{-1}$, udržovací 0,01-0,05 $mg.kg^{-1}$ rozděleně během dne (vyšší dávka pro ž.hm. do 3 kg, nejnižší pro ž.hm. nad 20 kg)
	F: 0,01 $mg.kg^{-1}$ 1x denně (bez nárazové dávky)
i.v.	(velmi zvolna) E, B: 5-10 mg
	O, Cp, S: 0,5 mg/50 kg ž.hm.
	C: 0,2-0,5 mg (zcela mimořádně až 0,04 $mg.kg^{-1}$ frakcionovaně během 4 h)

Letální dávky:

C: i.v., s.c.	0,2-0,5 $mg.kg^{-1}$	
	p.o.	0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$
F:	i.v.	0,3-0,4 $mg.kg^{-1}$
	s.c.	0,4-0,6 $mg.kg^{-1}$
	p.o.	0,15-0,4 $mg.kg^{-1}$

DILTIAZEMI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: vazodilatancia, antihypertenziva
Dávky: p.o. C: 0,5-1,25 $mg.kg^{-1}$ každých 6-8 h

DIMENHYDRINATUM
Farmakologická skupina, použití: antiemetika
Dávky: p.o. C: 4-8 $mg.kg^{-1}$

DIMERCAPROLUM
Farmakologická skupina, použití: detoxikancia; antidotum As a Hg
Dávky:

i.m.	(5-10% roztoky) obecně: 1. den 3-5 $mg.kg^{-1}$ každé 4 h
	2.-10. den 25 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h

DIMETHYLIS SULFOXIDUM
Farmakologická skupina, použití: antiflogistika (zevní)
Dávky: zevně na kůži v koncentraci minimálně 70%, C, F: do 5 ml; velká zvířata až 30 ml

DIMETICONUM
Farmakologická skupina, použití: antitympanika (odpěňovač)
Dávky:
p.o., intrarum. B: 1,5-5,0 (10 $mg.kg^{-1}$) v 1-5 l vody
Tele, O, Cp: 1,25 (také jen 2-10 $mg.kg^{-1}$)
p.o., injekčně
do caeca E: event. 0,75-1,5

DIPHENHYDRAMINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antihistaminika, antialergika, spasmolytika
Dávky:
i.m., i.v. Velká zvířata: 0,5-1 $mg.kg^{-1}$, také až 5 $mg.kg^{-1}$
Středně velká: 1-2 $mg.kg^{-1}$, také 3-6 $mg.kg^{-1}$
Malá zvířata: 1-2 $mg.kg^{-1}$, také až 3 $mg.kg^{-1}$

DIPHENOXYLATI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: obstipancia
Dávky: p.o. C, F: kolem 1 $mg.kg^{-1}$ každých 8 h

DOPAMINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: sympatomimetika
Dávky: (jen v infuzi)
i.v. obecně: 5-10-15 µg/kg/min
(40 mg v 500 ml Sol. Ringeri) i.v. C: 2-8 µg/kg/min (při šoku)

DOXYCYCLINI HYCLAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:
p.o. C, F: 10 $mg.kg^{-1}$ každých 12-24 h
Tele, S, G: 10 $mg.kg^{1}$ v pitné vodě či v krmivu každých 24 h

DOXYCYCLINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:
p.o. (jednou denně) C: 4-10 $mg.kg^{-1}$; F: 5-11 $mg.kg^{-1}$

DROPERIDOLUM
Farmakologická skupina, použití: antipsychotika, antiemetika
Dávky:
i.m. C: 0,5-1-2 $mg.kg^{-1}$
i.v. (zvolna) C: 0,25-0,5 $mg.kg^{-1}$
p.o., i.m. C, F: 0,02-0,04 $mg.kg^{-1}$ (antiemetika)

EPHEDRINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: centrální analeptika, sympatomimetika, periferní analeptika
Dávky:
s.c., i.m., p.o. obecně: kolem 0,5 (až 1) $mg.kg^{-1}$ každých 8-12 h
s.c. E, B: 0,5; O, Cp: 0,05; S: 0,1; C: 0,025; F, G: 0,002

EPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS
Farmakologická skupina, použití: sympatomimetika, hemostatika
Dávky (jednopromilového roztoku): p.o. C: až 0,5 ml (v oslazené vodě)

ERGOCALCIFEROLUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu D_2
Dávky (terapeutické):

p.o.	B, S, O: 10 $\mu g.kg^{-1}$; C, F: 12,5-100 µg
i.m., s.c.	E, B: 300 000-1 500 000 m.j.
	Hříbě, S: 300 000-600 000 m.j.
	Tele, C: 150 000-300 000 m.j.

ERGOMETRINI HYDROGENOMALEAS
Farmakologická skupina, použití: uterotonika (involuční periody)
Dávky:

i.m., i.v.	E, B: 10-20 mg; O, Cp: 0,5-2 mg; S: 1 mg
	C: 0,25-1 mg; F: 0,2-0,5 mg
	(při sectio caesarea do děložního rohu)

ERGOTAMINI TARTRAS
Farmakologická skupina, použití: uterotonika (tonické stahy)
Dávky: s.c., i.v. (zvolna) E, B: až 2,5 mg; O, Cp, S: 0,5-1 mg

ERYTHROMYCINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	Tele: 0,5 (druhý den 0,25)
	C, F: 2-5-10 $mg.kg^{-1}$ každých 4-6 h
	G: 25-80 $mg.kg^{-1}$ v pitné vodě, 20-25 $mg.kg^{-1}$ v krmivu
i.m.	B: 2-4 $mg.kg^{-1}$; tele, O, S: 10 $mg.kg^{-1}$ (maximálně 1,0)
	C, G: 20 $mg.kg^{-1}$ jako dosis refracta
intramam.	B: 0,3 do jedné čtvrtě
intrauter.	B: 0,6-1,2

ESTRADIOLI BENZOAS
Farmakologická skupina, použití: hormony (estrogeny), afrodisiaka, abortiva
Dávky:

i.m., (s.c.)	E: 5-10 mg (afrodisiaka)
	B: 0,5-1 mg (až 5 mg u anestrie post partum)
	S: 2 mg (u anestrie s HCG či PMSG)
	S, O, Cp: 0,5-2 mg
	C: 0,1-1 mg (substituce), 2-5 mg (5., 7., 9. den post coitum) zábrana nidace

FERROSI FUMARAS
Farmakologická skupina, použití: antianemika
Dávky:
p.o. C: 0,1-0,2; F: 0,05-0,3
Prasnice: 10,0; tele, hříbě: 2,0-3,0

FERROSI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: antianemika
Dávky:
p.o. (3x denně) Velká zvířata: 1,0-5,0
Středně velká zvířata: 0,5-1,0; malá zvířata: 0,1

FLUNITRAZEPAMUM
Farmakologická skupina, použití: antineurotika (ke zklidnění)
Dávky:
i.m. F: 0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$

FORMALDEHYDI SOLUTIO 35%
Farmakologická skupina, použití: dezinficiencia, antiseptika, antihydrotika, kaustika
Dávky:
p.o. (roztok s 0,1-0,2% formaldehydu)
E: 20,0; B: 30,0; C: 2,0
lokálně: na kůži roztok s 1-2 % formaldehydu (antihydrotikum)
na paznehty roztok s 2-5 % formaldehydu (tvrzení rohoviny)
K dezinfekci prostředí roztoky s 2-5 % formaldehydu

FUROSEMIDUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky:
p.o. E: 1,5-3 $mg.kg^{-1}$; B: 2-5 $mg.kg^{-1}$ až 2x denně
O: 1-5 $mg.kg^{-1}$; C, F: do 5 $mg.kg^{-1}$ až 2x denně
i.v. obecně: 0,5-2 $mg.kg^{-1}$ v 1% roztoku (při otravách)
s.c., i.m., i.v. E: 1-2,5 $mg.kg^{-1}$; B: 1 $mg.kg^{-1}$; S: 5 $mg.kg^{-1}$
O: 0,5 $mg.kg^{-1}$
C, F: 2,5-5 $mg.kg^{-1}$ rozděleně, (5-10-20 $mg.kg^{-1}$ jen při akutním selhání ledvin)
B: 0,5-0,8 při edému vemene, opakovat za 18 h

GALLAMINI TRIETHIODIDUM
Farmakologická skupina, použití: myorelaxancia
Dávky:
i.v. E: 0,5-1 $mg.kg^{-1}$; B: 0,4 $mg.kg^{-1}$; S: 3 $mg.kg^{-1}$
C: 0,3-1 $mg.kg^{-1}$; F: 0,11 $mg.kg^{-1}$

GENTAMICINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:
s.c., i.m., i.v. obecně 6,5-6,8 $mg.kg^{-1}$ každých 12 až 24 h (C od druhého dne 1x denně)
F: 5,1 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h

GLUCOSUM
Farmakologická skupina, použití: energetika, pomocné látky, diagnostika, celková hemostatika
Dávky:
i.v., s.c. (zpravidla 20-40% roztok) obecně pomalu: až 0,5 substance na kg ž.hm. každých 5-8 h
při ketóze B: 200,0; O: 50,0
při hypoglykemii C: 500 $mg.kg^{-1}$; sele: 3,0

GONADORELINUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (GnRH)
Dávky:
i.v. B: 0,25-0,5 $\mu g.kg^{-1}$
i.m. B: k synchronizaci říje návazně na podaný gestagen min. 60 µg pro toto, max. 1500 µg pro toto
S: 100 µg pro toto 2-3 h před inseminací

GONADOTROPINUM CHORIONICUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (gonadotropiny)
Dávky:
i.m., s.c. (s uplatněním účinku FSH): E, B: 1000 m.j.
O, Cp, S: 250-500 m.j.; C: 100-250 m.j.; F: 50-100 m.j.
(s uplatněním účinku LH): E, B: 5 000-10 000 m.j.
O, Cp, S: kolem 1000 m.j.; C: 500-1000 m.j.; F: 500 m.j.

GONADOTROPINUM SERICUM EQUINUM AD USUM VETERINARIUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (gonadotropiny)
Dávky:
i.m., s.c. Klisna: 4 m.j. na kg ž.hm.
Kráva, prasnice: 1-3 m.j. na kg ž.hm.

GRISEOFULVINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika, antimykotika
Dávky: p.o. E, B: 5-10 $mg.kg^{-1}$; C: 20-50 $mg.kg^{-1}$; F: 40-60 $mg.kg^{-1}$

GUAIFENESINUM
Farmakologická skupina, použití: anxiolytika; antineurotika, centrální myorelaxancia
Dávky:
i.v. (20% roztok) E: 3,0 na 50 kg ž.hm. (ataraktikum)
4,5-6,0 na 50 kg ž.hm. (k pokládání)
B: 2,5-5,0 na 50 kg ž.hm. (k pokládání)
C: 100-180 $mg.kg^{-1}$ (myorelaxace)
F: 40-80 $mg.kg^{-1}$
p.o. C, F: 20 $mg.kg^{-1}$ (ke zklidnění)

HALOPERIDOLUM
Farmakologická skupina, použití: antipsychotika, antiemetika
Dávky: p.o., i.m. C, F: 0,1-0,2 $mg.kg^{-1}$ (antiemetikum; sedativní účinek po dobu 24-96 h)

HEXACHLOROPHENUM
Farmakologická skupina, použití: anthelmintika, antitrematoda
Dávky: p.o. B: 15-20 $mg.kg^{-1}$; O: 20-40 $mg.kg^{-1}$

HYDROCHLOROTHIAZIDUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky:

p.o.	E: 0,25-0,5 (0,5-1 $mg.kg^{-1}$); B: až 0,7
	B: 0,5-0,8 s opakováním za 18 h (při edému vemene)
	C, F: 2-3 $mg.kg^{-1}$ (C: také 10-20 $mg.kg^{-1}$; F: maximálně 0,0125)
i.m.,s.c.,(p.o.)	O, S, C, F: 0,5-2 $mg.kg^{-1}$
p.o., parenter.	obecně 0,25-1 $mg.kg^{-1}$ (při otravách)
	S a zvláště C, F: 2-3 $mg.kg^{-1}$ (při otravách)

HYDROCORTISONI ACETAS
Farmakologická skupina, použití: hormony (kortikoidy), glukokortikoidy, antiflogistika
Dávky:

p.o.	obecně 1-2 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h (substituce)
p.o., i.m.	(krátkodobě) C, F: 5 $mg.kg^{-1}$ rozděleně na 2-3 dávky během 24 h (při astmatických a alergických stavech)
i.m.	obecná střední dávka 2-10 $mg.kg^{-1}$ každých 3-6 h
	E, B: 1,0-1,5; S: 0,025-0,05; C: 2 $mg.kg^{-1}$
	E, B: 2-3 $mg.kg^{-1}$ (astmatické a alergické stavy)
i.v. (zvolna)	obecně: 50 $mg.kg^{-1}$ každých 3-6 h (anafylaktický a endotoxinový šok)
intraartic.	6-250 mg na jeden kloub (podle velikosti)

HYDROCORTISONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (kortikoidy)
Dávky:

p.o.	C: 4 $mg.kg^{-1}$ 1x za 12 h nebo 0,5-1 $mg.kg^{-1}$ 1x denně (substituční terapie)
	F: 2-4 $mg.kg^{-1}$ 1x za 12 h

INSULINI SOLUBILIS INIECTIO
INSULINI ZINCI AMORPHI INIECTIO IN SUSPENSIONE
INSULINI ZINCI CRISTALLINI INIECTIO IN SUSPENSIONE
INSULINI ZINCI INIECTIO IN SUSPENSIONE
INSULINUM
Farmakologická skupina, použití: hormony, antidiabetika
Dávky:

s.c., i.v.	individuálně podle stavu nemocného
	E: 250 m.j.; B: 300 m.j.; O, S: 25-50 m.j.; Cp: 30 m.j.
	C: 20-30 m.j.
	(Ke kontinuální terapii diabetu C: 1-2 m.j./kg ž.hm.; F: 0,5 m.j./kg ž.hm.)

IPECACUANHAE PULVIS NORMATUS
IPECACUANHAE RADIX
Farmakologická skupina, použití: expektorancia, emetika
Dávky:

p.o.	(expektorancia) E: 1,0-2,0; B: 2,0-5,0; O, Cp, S: 0,1-0,3 C: 0,01-0,1; F: 0,05-0,1 (emetikum) S: 3,0; C: 1,5; F: 0,5

ISOPRENALINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: sympatomimetika
Dávky:

i.v. (zvolna)	obecně: až 4 $\mu g.kg^{-1}$ a dále
i.m., s.c.	7-14 $\mu g.kg^{-1}$ každé 4 h
i.m., s.c.	obecně 3,5-10 $\mu g.kg^{-1}$
i.v. infuze	C: 0,1-0,3 µg/kg/min nebo 5-20 µg/kg/min do účinku při léčbě hypotenze při anafylaktickém šoku
p.o.	C, F: 15-30 mg pro toto při šoku u intoxikací

KALII ACETAS
Farmakologická skupina, použití: soli a ionty k perorálnímu a parenterálnímu použití, diuretika
Dávky: 33% roztoku (3x denně) p.o. E, B: kolem 100 ml; O, Cp, S: 15 ml; C: 5 ml

KALII BROMIDUM
Farmakologická skupina, použití: sedativa
Dávky:

p.o.	E: 50,0 (2x denně); B: 60,0 (3x denně) O, Cp, S: 10,0 (3x denně) C: 1,0-2,0 (d.pro die 2,0-6,0); F: 0,5

KALII IODIDUM
Farmakologická skupina, použití: expektorancia
Dávky:

p.o.	E, B: 5,0 (maximálně 10,0); O, Cp: 1,0 (maximálně 2,0) S: 1,0 (maximálně 3,0); C: 0,1-0,5 (maximálně 1,0) F: maximálně 0,2; G: maximálně 0,1

KANAMYCINI MONOSULFAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky: parenterálně obecně: až 15 $mg.kg^{-1}$ d.pro die

KETAMINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: celková anestetika (k imobilizaci s obluzením)
Dávky:

i.m.	obecně 10-30 $mg.kg^{-1}$ průměrně O, Cp, S: 10-20 $mg.kg^{-1}$ C: 8-10 $mg.kg^{-1}$ (po premedikaci xylazinem) O: 22-44 $mg.kg^{-1}$; S: 6-12 $mg.kg^{-1}$; C: 20-30 $mg.kg^{-1}$

F: 12-30 mg.kg^{-1}; ptáci: 20-40 mg.kg^{-1} (malí až 100 mg.kg^{-1})
i.v. přibližně 1/4 až 1/3 dávky nitrosvalové

KETOPROFENUM
Farmakologická skupina, použití: antiflogistika, antirevmatika
Dávky:
p.o. obecně (mimo potravinová zvířata): 1 mg.kg^{-1}
C: 1 mg.kg^{-1} (každých 6-8 h)
p.o., s.c. F: 2 mg.kg^{-1}
i.v., i.m., s.c. C: 2 mg.kg^{-1}

LANATOSIDUM C
Farmakologická skupina, použití: kardiotonika
Dávky: Lze vycházet z dávek digoxinu i.v. $\mathbf{LD_{50}}$ pro F 0,23 mg.kg^{-1}

LEVAMISOLI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: anthelmintika
Dávky:
p.o. obecně: 7,5-15 mg.kg^{-1}
B, O, S (mimo dojnice a bahnice): 8 mg.kg^{-1}
s.c., i.m. obecně: 5 mg.kg^{-1}
s.c. B, O, S: 8 mg.kg^{-1}; C, F: 10 mg.kg^{-1}
nalévání jen B: 10 mg.kg^{-1}

LIDOCAINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: anestetika (lokální), antiarytmika
Dávky:
i.v. C: 2-4 mg.kg^{-1}, následně i.m. až 6 mg.kg^{-1} každých 90 min. podle potřeby (antiarytmikum)

LINCOMYCINI HYDROCHLORIDUM MONOHYDRICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:
(p.o.) C, F: 20 mg.kg^{-1} každých 12 h
i.m. S, C, F: 10 mg.kg^{-1} každých 12 h

LOPERAMIDI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: obstipancia
Dávky:
p.o. C: 0,04 mg.kg^{-1} každých 6-8 h
(nepodávat novorozeným a F!)

LYSINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: aminokyseliny, homeostatika, roborancia
Dávky:
i.m., i.p., s.c. (maximálně 20-30 ml na jedno místo)
i.v. obecně: 100-200 mg.kg^{-1}, opakování možné za 6 h
E, B: 40,0-80,0; tele: 10,0-20,0
O: při intoxikacích až 20,0

MAGNESII CHLORIDUM HEXAHYDRICUM
Farmakologická skupina, použití: soli a ionty k perorálnímu a parenterálnímu použití
Dávky: s.c. B: 80,0

MAGNESII HYDROXIDUM
Farmakologická skupina, použití: antacida
Dávky: p.o. B: 100,0-300,0; O: 10,0-30,0; C: 10,0-20,0

MAGNESII OXIDUM PONDEROSUM
Farmakologická skupina, použití: antacida; substituce hořčíku
Dávky:
p.o. E: 10,0-40,0; B: 10,0-40,0 (opakovaně po 30 min)
C: 0,5
E, B: 70 $mg.kg^{-1}$ (B: 50,0-70,0); O, Cp, S: 80,0 $mg.kg^{-1}$
C: 0,2-1,0

MAGNESII SULFAS
Farmakologická skupina, použití: laxancia, stomachika
Dávky:
jako laxans p.o. ve 3-5% vodném roztoku
E: až 250,0
B: až 1000,0; hříbě, tele: 25,0-50,0
O, Cp, S: 25,0-125,0; C: 5,0-25,0; F: 2,0-5,0

MAGNESII TRISILICAS
Farmakologická skupina, použití: antacida
Dávky: p.o. C: 20 $mg.kg^{-1}$

MANNITOLUM
Farmakologická skupina, použití: osmotická diuretika
Dávky:
i.v. přísně v 10-20% roztoku zvolna obecně: 0,3/kg/h
ve 2,5% roztoku 1000 $mg.kg^{-1}$ (při intoxikacích)
D.max. 1500 $mg.kg^{-1}$

MEBENDAZOLUM
Farmakologická skupina, použití: anthelmintika
Dávky:
p.o. E: 5-10 $mg.kg^{-1}$ (snášená dávka až 350 $mg.kg^{-1}$)
O: 10-20 $mg.kg^{-1}$; S: 20-30 $mg.kg^{-1}$ (v krmivu)
C: 40-100 $mg.kg^{-1}$; F: až 40 $mg.kg^{-1}$
G: 60 $mg.kg^{-1}$ (v krmivu)

MEDROXYPROGESTERONI ACETAS
Farmakologická skupina, použití: hormony (gestageny)
Dávky:
i.m. C: 2,5 $mg.kg^{-1}$ (těžší zvířata) až 5 $mg.kg^{-1}$ (lehčí)
p.o. C: 0,5 $mg.kg^{-1}$ (0,005-0,01)

MEPROBAMATUM
Farmakologická skupina, použití: anxiolytika, antineurotika, centrální myorelaxancia
Dávky: p.o. S: 20 $mg.kg^{-1}$; C: 20-40 $mg.kg^{-1}$; F: 10-30 $mg.kg^{-1}$

METHADONI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika; spasmolytika
Dávky:

i.v.	E: 0,1 $mg.kg^{-1}$; C: až 0,25 $mg.kg^{-1}$
i.m.	C: 0,5-5 $mg.kg^{-1}$ (silné analgetikum)
s.c.	C: 1 $mg.kg^{-1}$ (premedikace thiopentalové narkózy)
	LD_{50} C: i.v. 25 $mg.kg^{-1}$, s.c. 50 $mg.kg^{-1}$, p.o. C: 70 $mg.kg^{-1}$

METHYLPREDNISOLONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (glukokortikoidy)
Dávky:

i.m.	E: 0,2; C: 1-4 $mg.kg^{-1}$
i.v.	C, F: 4-10 (-30) $mg.kg^{-1}$ (akutní anafylaktické reakce)

METHYLTESTOSTERONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (androgeny)
Dávky:

p.o.	C: 0,005-0,01 (1-3x denně, pes event. obden) nebo 0,5 $mg.kg^{-1}$ (maximálně 0,03 pro toto pro die)
	F: 0,0025-0,005 1x až 2x denně

METOCLOPRAMIDI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antiemetika
Dávky:

p.o., parenter.	C: 0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$
p.o., p.rect., i.m., s.c., i.v.	C, F: 0,1-0,3 (až 1) $mg.kg^{-1}$ každých 8 h

METRONIDAZOLUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika; antiprotozoika
Dávky:

p.o.	B: 50 $mg.kg^{-1}$; S: 100 $mg.kg^{-1}$; C: 20-50 $mg.kg^{-1}$
i.v.	B: 75 $mg.kg^{-1}$ 3x vždy po 12 h (trichomoniáza býků)

MORPHINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika, analgetika-anodyna
Dávky:

s.c., i.m.	E: 0,3-0,6 (D.L. acuta 3,5-15,0)
	C: 5 $mg.kg^{-1}$; 0,02-0,15 (D.L. acuta 0,8-5,3)
s.c.	F: d.max. 0,1 $mg.kg^{-1}$
i.v.	E: 0,4; C: dosis letalis 100-200 $mg.kg^{-1}$

NALOXONI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antidotum při otravě morfinem, jeho deriváty a analogy, terapie šoku
Dávky:

i.v., i.m., s.c.	C: 0,01-0,04 $mg.kg^{-1}$ opakovaně
i.v.	F: 0,0004-0,0015
i.v.	obecně: 0,01-0,04 $mg.kg^{-1}$ opakovaně (antidotum)
i.m.	obecně: 0,02-0,12 $mg.kg^{-1}$ opakovaně (antidotum)
i.v.	C: kolem 0,05 $mg.kg^{-1}$ opakovaně po 2-3 min (antidotum)

NAPROXENUM
Farmakologická skupina, použití: antiflogistikum (nesteroidní)
Dávky:

p.o.	E: 10 $mg.kg^{-1}$ (maximálně po dobu 14 dní)
	C: 5 $mg.kg^{-1}$ (další dny dávky poloviční)

NATRII BROMIDUM
Farmakologická skupina, použití: sedativa
Dávky:

p.o.	E, B: až 50,0 2x denně
	O, Cp, S: kolem 5,0 3x denně
	C: kolem 1,0 (2,0-5,0 d.pro die)

NATRII CALCII EDETAS
Farmakologická skupina, použití: antidota
Dávky: infuze v izotonickém roztoku NaCl či glukosy obecně: 25 $mg.kg^{-1}$
v koncentraci maximálně 20 % každých 6 h po dobu 2-5 dní
D.max. pro kura: 500 $mg.kg^{-1}$

NATRII HYDROGENOCARBONAS
Farmakologická skupina, použití: antacida
Dávky:

p.o.	B: 60,0-120,0; O: 40,0-60,0
	C: 50-100 $mg.kg^{-1}$, resp. 25-50 $mg.kg^{-1}$ 2-3x denně

NATRII IODIDUM
Farmakologická skupina, použití: thyreoidalia (resorbens zánětlivých procesů, aktinomykóza, botryomykóza)
Dávky:

p.o.	obecně průměrně 1-10-20 $mg.kg^{-1}$
	B: 2,0-8,0; O, Cp: 0,5-1,5; C: 0,1-0,25; F: 0,05-0,08
i.v.	obecně kolem 10 $mg.kg^{-1}$

NATRII SULFAS DECAHYDRICUS
Farmakologická skupina, použití: laxancia, stomachika
Dávky:

p.o.	(stomachikum) E, B: 40,0; O, Cp: 10,0; S: 5,0; C: asi 1,0
p.o.	(laxans) obecně 1,0/kg ž.hm. (u B i více)

NATRII THIOSULFAS
Farmakologická skupina, použití: detoxikancia
Dávky:

i.v.	ve 20% roztoku obecně 30 $mg.kg.^{-1}$
p.o.	s vodou Velká zvířata: až 100,0
	Středně velká: až 30,0, malá zvířata: až 10,0

NEOMYCINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	E: 5-20 $mg.kg^{-1}$ 1x až 2x denně
	Tele: 10-30 $mg.kg^{-1}$ každých 6-12 h, nebo 20-50 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
	O: 30-75 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h
	C: 10-25 $mg.kg^{-1}$ každých 6 h
	F: 25 $mg.kg^{-1}$ každých 6-8 h; G: 50 mg
i.m.	každých 8-12 h Tele: 10-20 $mg.kg^{-1}$; S: 7-12 $mg.kg^{-1}$
	každých 6-8 h C: 3-5 $mg.kg^{-1}$; F: 2-5 $mg.kg^{-1}$
	G: 25 $mg.kg^{-1}$

NEOSTIGMINI BROMIDUM
Farmakologická skupina, použití: parasympatomimetika
Dávky:

s.c.	E: až 0,025; B: až 0,05; O, Cp: až 0,01; S: až 0,015
	C: až 0,002-0,004; F: až 0,0004-0,0008

NICETHAMIDUM
Farmakologická skupina, použití: analeptika
Dávky: ve 25% roztoku s.c, i.m., event. p.o., obecně 20-40 $mg.kg^{-1}$

NICOTINAMIDUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu PP
Dávky:

p.o.	obecně: 0,2-1 $mg.kg^{-1}$; G: až 10 $mg.kg^{-1}$
	S: kolem 3 $mg.kg^{-1}$ (nekrózy intestina s enteritidou)
	C, F: 7-10 $mg.kg^{-1}$ 3x denně

NOREPINEPHRINI HYDROGENOTARTRAS
Farmakologická skupina, použití: sympatomimetika, periferní analeptikum
Dávky:

s.c., i.m.	C: 0,05-0,5 mg
i.v.	infuze C: 1 µg/kg/min (k terapii šoku)
i.m., s.c., i.v.	F: 0,1 $mg.kg^{-1}$

NYSTATINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika (antimykotika)
Dávky:

p.o.	C: 10 000-20 000 m.j./kg ž.hm. každých 8 h při kandidóze (jinak zevně)

OUABAINUM
Farmakologická skupina, použití: kardiotonika
Dávky:

i.v.	velmi zvolna (s 5%-10%-20% roztokem glukosy)
	E: 0,003 (také 0,5-1 mg na 50 kg ž.hm. obden)
	B: event. 0,002-0,003; O, S: až 0,005
	C: 0,02-0,03 $mg.kg^{-1}$ jako dosis refracta denně (3-5 dávek)

OXAZEPAMUM
Farmakologická skupina, použití: anxiolytika; antineurotikum
Dávky: p.o. F: 0,2 $mg.kg^{-1}$

OXYTETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	obecně (kromě přežvýkavců): 10-55 $mg.kg^{-1}$ rozděleně během 24 hodin
	Tele: 23 $mg.kg^{-1}$; S, sele, C, F: 33-44 $mg.kg^{-1}$
	G: až 55,0 ve 100 litrech vody
i.m., s.c.	Velká zvířata: 1,5-4 $mg.kg^{-1}$
i.v.	Malá zvířata: 5-10 $mg.kg^{-1}$

OXYTETRACYCLINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	obecně (kromě přežvýkavců): 15-20 $mg.kg^{-1}$ rozděleně během 24 h
	C: 20 $mg.kg^{-1}$ 3x denně; F: 15 $mg.kg^{-1}$ 3x denně
i.m.	E, B: 5-8 $mg.kg^{-1}$; S: 10-15 $mg.kg^{-1}$
	Malá zvířata: 10-20 $mg.kg^{-1}$

OXYTOCINUM
Léková forma: INJ; **vet.:** INJ
Farmakologická skupina, použití: hormony; uterotonika
Dávky (rozmezí pro různé indikace):

i.m., s.c.	E: 10-30 m.j. (i 50-60 m.j. v infuzi)
	B: 20-50 m.j. (i 60-80 m.j.)
	O, Cp: 10-30 m.j.
	C: 2-5 m.j. (také 0,3 $mg.kg^{-1}$); F: 2-5 m.j.
i.v.	uvedené dávky aplikovat velmi zvolna

PANCURONII BROMIDUM
Farmakologická skupina, použití: myorelaxancia
Dávky: i.v. C: 0,02-0,03 $mg.kg^{-1}$

PAPAVERINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: spasmolytika
Dávky:

s.c.	E, B: 1-1,5 $mg.kg^{-1}$; O, Cp, S: 2-4 $mg.kg^{-1}$
	C: 3-6 $mg.kg^{-1}$; F: 3-10 $mg.kg^{-1}$

PARACETAMOLUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika, antipyretika
Dávky:
p.o. E: 15,0-25,0; B: 15,0-30,0; O, Cp: 2,0-5,0; S: 1,0-2,0
C: 0,25-0,4 (také 10 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h)

PARAFFINUM LIQUIDUM
Farmakologická skupina, použití: laxancia, pomocné látky
Dávky:
p.o. obecně 1-2 ml/kg ž.hm. (i více)
E (nosojícnovou sondou): 1000-3000 ml; B: 500-1000 ml
O, Cp, S: 150-300 ml; C: 5-30 ml; F: 2-5 ml
p.rect. (tlakové klyzma) E: 500-1000 ml

PENICILLAMINUM
Farmakologická skupina, použití: detoxikancia (otrava těžkými kovy)
Dávky:
p.o. obecně: 20 $mg.kg^{-1}$ denně
i.v. 15 $mg.kg^{-1}$ opakovaně

PENTOBARBITALUM
Farmakologická skupina, použití: hypnotika, sedativum
Dávky: i.v. obecně 2-5 $mg.kg^{-1}$

PENTOBARBITALUM NATRICUM
Farmakologická skupina, použití: hypnotika, narkotika
Dávky:
i.v. obecně 1-2 $mg.kg^{-1}$ (hypnotikum-sedativum)
E, B: 7,5 (narkotikum, v kombinaci s jinými)
O, Cp: 1,0 (narkotikum)
S (jen do 50 kg ž.hm.): 10-30 $mg.kg^{-1}$ (narkotikum)
C, F: 20-35 $mg.kg^{-1}$ (narkotikum)
(**D.L.** pro C: 62 $mg.kg^{-1}$)
i.p. F: 30 $mg.kg^{-1}$ (narkotikum)
(**D.L.** pro F**:** 60 $mg.kg^{-1}$)

PEPSINI PULVIS
Farmakologická skupina, použití: digestiva
Dávky: p.o. (s vodou) E, B (zřídka): 5,0-10,0; S: 2,0; C: 0,5

PHENACETINUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika, antipyretika
Dávky: p.o. (až 3x denně) E: 10,0-20,0; B: 15,0-30,0; O, Cp: 1,0-4,0; S: 0,5-3,0; C: 0,1-2,0; F: 0,05-0,2

PHENAZONUM
Farmakologická skupina, použití: analgetika, antipyretika
Dávky: p.o. E, B: 30,0; O, Cp: 5,0; S: 7,5; C: 3,0; F: 0,05-0,5

PHENOBARBITALUM
Farmakologická skupina, použití: hypnotika, sedativa
Dávky:

p.o.	S: až 2,0; C: 0,05-0,8 (3-6 $mg.kg^{-1}$); F: 0,02-0,06
	obecně (jako antikonvulsivum): 6-12 $mg.kg^{-1}$
	G: 20,0-40,0 na 100 kg krmné směsi
i.m.	C: 1,2 (15-20 $mg.kg^{-1}$ vyvolá až 12hodinový spánek)
	E, S: 5-10 $mg.kg^{-1}$
i.v.	C: 2-6 $mg.kg^{-1}$ (opakovat při status epilepticus)

PHENOBARBITALUM NATRICUM
Farmakologická skupina, použití: hypnotika, sedativa
Dávky:

i.v.	E: 4,0-6,0; S: 0,25-1,5; C: 0,03-0,3; F: 0,015-0,06
i.m.	C: 60 $mg.kg^{-1}$ (jako antikonvulsivum)

PHENOXYMETHYLPENICILLINUM KALICUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky: p.o. C, F: 8-16 $mg.kg^{-1}$ 3x za den

PHENYLBUTAZONUM
Farmakologická skupina, použití: antiflogistika, antirevmatika
Dávky:

p.o.	C: 2-15 $mg.kg^{-1}$ (každých 8h); d.max.p.d.: 0,8 pro toto
	Štěně: 2-4 $mg.kg^{-1}$ (každých 8 h)
	E: 4-8 $mg.kg^{-1}$ (4 $mg.kg^{-1}$ každých 12 h, od 3. dne dávky nižší); d.max. d.pro die, 4,0 pro toto
	B: 9 $mg.kg^{-1}$ (iniciální dávka, pak obden poloviční)
	S: 2-4 $mg.kg^{-1}$
i.v.	C: 15-25 $mg.kg^{-1}$ (maximálně po 2 dny)
	E: 4 $mg.kg^{-1}$ (rozděleně na 3 díly, maximálně po 5 dní)

PHOLCODINUM
Farmakologická skupina, použití: antitusika
Dávky: p.o. C: 0,5-1 $mg.kg^{-1}$

PHTHALYLSULFATHIAZOLUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika
Dávky:

p.o.	(rozděleně během 24 h) E, B: 100-250 $mg.kg^{-1}$
	S: 100 $mg.kg^{-1}$
	C: 150 $mg.kg^{-1}$ (první den 300 $mg.kg^{-1}$)
	F: 500 $mg.kg^{-1}$ (první den 750 $mg.kg^{-1}$)

PHYSOSTIGMINI SALICYLAS
Farmmakologická skupina, použití: parasympatomimetika
Dávky:
s.c. E: až 0,05; B: až 0,1: O, Cp: až 0,02; S: až 0,03
C: 0,002 až 0,004; F: až 0,0008

PHYSOSTIGMINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: parasympatomimetika
Dávky:
s.c. E: 0,03 (laxans)

PHYTOMENADIONUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy; karence vitaminu K_1, detoxikancia
Dávky (při otravě kumarinovými deriváty):
i.m. B: 2-4 $mg.kg^{-1}$; S: 1-2 $mg.kg^{-1}$
i.v. C, F: 0,25-5 $mg.kg^{-1}$ (2x denně, nebezpečí šoku)

PILOCARPINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: parasympatomimetika
Dávky:
s.c. E: 0,1-0,3 (laxans), d.max. 0,5
B: 0,2-0,4, d.max. 0,6; O, Cp: 0,02
S: 0,002-0,02 (0,05-0,06 na 100 kg ž.hm. - emetikum)
C: 0,002-0,02; F: 0,01-0,02

PIPERAZINI ADIPAS
PIPERAZINI CITRAS
Farmakologická skupina, použití: anthelmintika
Dávky:
p.o. E: 100-300 $mg.kg^{-1}$ (až 80,0 pro toto); hříbě: až 30,0
B: 200-400 $mg.kg^{-1}$; tele: 250 $mg.kg^{-1}$
O, Cp: 400-800 $mg.kg^{-1}$; S: 275-440 $mg.kg^{-1}$ (až 40,0)
C: 110-200 $mg.kg^{-1}$; F: 150 $mg.kg^{-1}$; G: 300-500 $mg.kg^{-1}$

PIROXICAMUM
Farmakologická skupina, použití: antiflogistikum
Dávky: p.o. C: 0,3 $mg.kg^{-1}$ (1x za 48 h)

POLYMYXINI B SULFAS
Farmakologická skupiuna, použití: antibiotika
Dávky:
p.o. Malá zvířata: 7-8 $mg.kg^{-1}$ d.pro die (enteritidy)
intramam. B: 130-260 mg do jedné čtvrtě

PRAZIQUANTELUM
Farmakologická skupina, použití: anthelmintika
Dávky: p.o., i.m., s.c. C, F: 5 $mg.kg^{-1}$

PREDNISOLONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (glukokortikoidy)
Dávky:

i.v. (zvolna)	obecně: 10-30 $mg.kg^{-1}$ (akutní anafylaktická reakce)
i.m., p.o.	C: 1-3 $mg.kg^{-1}$ (iniciální terapie alergií, zánětů)
	F: 2-5 $mg.kg^{-1}$ rozděleně během dne (iniciální terapie alergií, zánětů)
intraartic.	5-250 mg na jeden kloub

PREDNISONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (glukokortikoidy)
Dávky:

p.o.	C: 0,25 $mg.kg^{-1}$ (denně, substituční terapie)
	2 $mg.kg^{-1}$ až 2x denně (lokální anafylaxe)

PROCAINAMIDI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antiarytmika
Dávky: p.o., i.m. obecně: 6 $mg.kg^{-1}$ každé 3 h, nebo až 17 $mg.kg^{-1}$ každé 4 h

PROCAINI BENZYLPENICILLINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky (jednou denně):

i.m.	E: 20 000-40 000 m.j./kg ž.hm.
	B: 15 000-30 000 m.j./kg ž.hm.
	S: 20000 m.j./kg ž.hm.
s.c., i.m.	O, Cp: 20 000-45 000 m.j./kg ž.hm.
	Tele: 9 000-30 000 m.j./kg ž.hm.
	Sele: 12 000-18 000 m.j./kg ž.hm.
	C: 15 000-30 000 m.j./kg ž.hm.
	F: 30 000-40 000 m.j./kg ž.hm.
	(2x denně) i.m. G: 20 000-50 000 m.j./kg ž.hm.
intramam.	B: 200 000-400 000 m.j.

PROCAINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: anestetika (lokální)
Dávky:

Anestezie	
- infiltrační	E: 2% roztok až 125 ml (2,5 g); S: 2% až 20 ml (0,4 g)
	C, F: 2% roztok až 20 ml (0,2 g)
- svodná	E, B: 5% roztok až 50 ml (2,5 g)
Roztoky s epinefrinem:	
Anestezie	
- infiltrační	E, B: 2% až 150 ml (3,0 g); C, F: 2% až 15 ml (0,3 g)
- svodná	E, B: 5% až 25 ml (1,25 g)
- extraduralní	
kaudální	O, Cp: 2% až 5 ml (0,1 g)
	Poznámka: Toxicita stoupá s koncentrací roztoku.
i.v.	obecně: v 1% roztoku 1 mg na kg ž.hm. (při anurii)

PROGESTERONUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (gestageny)
Dávky:
i.m., s.c. E: až 0,45 (nymfomanie); 0,125 (oddálení říje)
B: až 0,25 (ovariální cysty, habituální potrat) také až 0,5 (habituální potrat)
O: až 0,03 (cysty); S: až 0,06 (cysty)
C, F: 0,03-0,06 (zabránění říje)

PROMETHAZINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antihistaminika, neuroleptika
Dávky: p.o. C: 2 $mg.kg^{-1}$ (antikinetikum)

PROPRANOLOLI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antiarytmika
Dávky: i.v. (zvolna) C: 2 $mg.kg^{-1}$; F: 1-2,5 $mg.kg^{-1}$

PROPYLENGLYCOLUM
Farmakologická skupina, použití: pomocné látky (při ketóze)
Dávky: p.o. (2x denně) B: 200-400 ml; O: 75 ml

PYRIDOXINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu B_6
Dávky: p.o., parenterálně E, B, S: 0,2-1 $mg.kg^{-1}$; C, F: 2-5 $mg.kg^{-1}$

QUINIDINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: antiarytmika
Dávky:
p.o. E: 10,0 každých 6-8 h
C: 0,05-0,1 (1. dávka - testovací), dále 5-10 $mg.kg^{-1}$ každých 5-6 h

QUININI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antiparazitika, antipyretika, uterotonika, antiarytmika
Dávky:
p.o. E, B: 10,0-25,0; O, Cp, S: 2,0-5,0; C: 0,25-1,0
F: 0,1-0,25
(uterotonikum) B: 10 $mg.kg^{-1}$; S: 1,5 (rozděleně); C: 25 $mg.kg^{-1}$
i.v. (antiarytmikum) E: 1,0-2,0; C: 0,1, ev. p.o. opakovaně

RESERPINUM
Farmakologická skupina, použití: hypotenziva, antineurotika
Dávky: i.m. C: 0,1 $mg.kg^{-1}$; F: 0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$; G: 0,1-0,2 $mg.kg^{-1}$

RESORCINOLUM
Farmakologická skupina, použití: antiseptika
Dávky: p.o. E: 15,0; B: 20,0; O, Cp: 4,0; S: 5,0; C: 1,5; G: 0,1

RIBOFLAVINUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu B_2
Dávky: p.o., parenter. obecně 0,1-0,5 $mg.kg^{-1}$; (C i 2x denně)

RICINI OLEUM
Farmakologická skupina, použití: laxancia
Dávky: p.o. obecně: 1,0/kg ž.hm. (i více) v emulzi s vodou

RIFAMPICINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

p.o.	C: 10-20 $mg.kg^{-1}$
p.o., i.m.	Hříbě: 10-25 $mg.kg^{-1}$ (korynebakterium pneumonie)
intramam.	B: 50-100 mg do jedné čtvrtě 2x za den

SCOPOLAMINI HYDROBROMIDUM
Farmakologická skupina, použití: parasympatolytika
Dávky:

s.c.	E, B: 0,01-0,05; S, O, Cp: 0,005-0,01; C: 0,003-0,01
	F: 0,003-0,005
i.m.	E: 0,02
i.m., p.o.	C: 0,0003-0,0015

SPIRAMYCINUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

i.m.	B, O, Cp: 10-25 $mg.kg^{-1}$; S: 25-50 $mg.kg^{-1}$
	C, F: 10-12 $mg.kg^{-1}$; G: 25-100 $mg.kg^{-1}$
s.c.	krocan: 15 $mg.kg^{-1}$
loc.	krocan: 10 mg (sinusitida)

SPIRONOLACTONUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky: p.o. C, F: 2-4 $mg.kg^{-1}$

STREPTOMYCINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:

i.m., s.c.	obecně (kromě F) 10 $mg.kg^{-1}$ najednou nebo rozděleně během 24 h; u těžkých infekcí uvedená dávka 2x až 3x během 24 h
i.m.	E: 5-10 $mg.kg^{-1}$ 2x denně
	B: 10-15 $mg.kg^{-1}$ 2x až 3x denně
	Tele: 1,0; O: 10-25 $mg.kg^{-1}$ 1x až 2x denně
	S: 20-30 $mg.kg^{-1}$; C: 50 $mg.kg^{-1}$ 1x až 2x denně
	G: 20-35 $mg.kg^{-1}$ 2x až 4x denně
p.o.	Tele: 0,5-1,0; S: 20-40 $mg.kg^{-1}$; F: 250 mg; G: 200 mg
intramam.	B: 0,1-00,5 do jedné čtvrtě

SULFACETAMIDUM NATRICUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika
Dávky:
p.o. (rozděleně) obecně 120-150 $mg.kg^{-1}$
C: až 500 $mg.kg^{-1}$

SULFADIMIDINUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika
Dávky:
p.o. obecně: 120-200 $mg.kg^{-1}$
nárazová dávka: E, B: 100,0; O, Cp: 12,0; S: 20,0; C: 4,5; F: 0,4
udržovací: E, B: 75,0; O, Cp: 9,0; S: 15,0; C: 3,0; F: 0,3

SULFAFURAZOLUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika
Dávky: p.o. (rozděleně) C: kolem 100 $mg.kg^{-1}$

SULFAMETHOXAZOLUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika
V kombinaci s trimethoprimem **dávky:**
i.m. B: až 8,0
i.m. S: až 3,0; odstávče: až 0,6; sele: 20 $mg.kg^{-1}$
s.c. Tele: 0,8-2,0
C, F (do 5 kg ž.hm.): 0,1-0,2
C (do 10 kg ž.hm.): 0,2-0,4
C (10-20 kg ž.hm.): 0,3-0,8

SULFAMETHOXYPYRIDAZINUM
Farmakologická skupina, použití: chemoterapeutika
Dávky:
i.v., i.m., s.c. obecně (kromě O, Cp): 50-75 $mg.kg^{-1}$
p.o. O, Cp: 50 $mg.kg^{-1}$

TANNINUM
Farmakologická skupina, použití: adstringencia, antidota
Dávky:
p.o. v nápoji, v krmivu (i 2x denně)
Velká zvířata: 15,0-20,0
Středně velká: 2,0-4,0
Malá zvířata: 0,2-1,0
(jako antidotum v 0,5% roztoku)

TEREBINTHINAE ETHEROLEUM RECTIFICATUM
Farmakologická skupina, použití: antiseptika, derivancia, expektorancia
Dávky:
p.o. se slizem až 3x denně
E, B: 5,0-10,0 (d.max.p.d. 40,0)
O, Cp, S: 0,5-1,0 (d.max.p.d. 5,0)
C: 0,1-0,2 (d.max.p.d. 2,0)

TESTOSTERONI PROPIONAS
Farmakologická skupina, použití: hormony (androgeny)
Dávky:
i.m., s.c. obecně: 0,25-0,5 $mg.kg^{-1}$
E, B: 0,1-0,3; O, Cp, S: 0,1; C: 0,01-0,05; G: 0,01

TETRACYCLINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antibiotika
Dávky:
p.o. obecně 20 $mg.kg^{-1}$ každých 8 h
i.m. S: 5-8 $mg.kg^{-1}$; tele: 15 $mg.kg^{-1}$
Malá zvířata: 10-15 $mg.kg^{-1}$
intrauter. B: 3,0-4,0 (čípky), 1,0-2,0 (vaginety)

THEOBROMINUM
THEOPHYLLINUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky:
p.o. (1x až 3x denně)
E, B: 5,0-10,0; O, Cp, S: 1,0-2,0; C: až 0,5; F: 0,1

THIAMINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminy B_1, při polyneuritidách
Dávky:
p.o. obecně: kolem 2-4 $mg.kg^{-1}$; C: 0,05-0,1; F: 0,05
s.c., i.m. obecně: 0,5-2 $mg.kg^{-1}$; F (i.m.): až 0,005 (2x)
i.v. při intoxikacích působených antagonisty: 0,5-2 $mg.kg^{-1}$

THIOPENTALUM NATRICUM ET NATRII CARBONAS
Farmakologická skupina, použití: celková anestetika
Dávky:
i.v. E: 8-15 $mg.kg^{-1}$ (rychle, 2-5% roztok)
B: 10-15 $mg.kg^{-1}$ (5% roztok); tele: 15-20 $mg.kg^{-1}$
O: 10-15 $mg.kg^{-1}$; Cp: 18-20 $mg.kg^{-1}$ (5% roztok)
S (do 45 kg ž.hm.): 15-20 $mg.kg^{-1}$
(do 90 kg ž.hm.): 14-17 $mg.kg^{-1}$
(do 150 kg ž.hm.): 10-15 $mg.kg^{-1}$
C: 15-30 $mg.kg^{-1}$ (**dosis letalis** kolem 55 $mg.kg^{-1}$)
F: kolem 20 $mg.kg^{-1}$ (i.p. 60 $mg.kg^{-1}$)

THYMOLUM
Farmakologická skupina, použití: při meteorismu, bronchitidě, jako anthelmintika, zevně jako antimykotika
Dávky:
p.o. E: 10,0-15,0; B: 15,0-20,0; O, Cp: 2,0; S: 2,0-5,0
C: 1,0-5,0; F: 0,1-0,5; G: 0,06

TOCOFEROLI ALFA ACETAS
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu E
Dávky:

obecně p.o.	40 mg.kg^{-1} denně (k substituci)
	Drůbež: 300 mg.kg^{-1} jednorázově
	parenterálně mláďata: 25 mg.kg^{-1}
p.o.	E: 1,0-1,6, hříbě: 0,2-1,0
	B: 0,8-1,2, tele: 0,2-2,0
	O, Cp: 0,2-0,4; jehně: 0,1-0,2
	S: 0,4-0,8, sele: 0,04-0,1
	C: 0,06-0,2; G: 0,008-0,016
i.m., s.c.	Velká zvířata 0,6-1,2; středně velká, tele: 0,3
	Jehně: 0,03; malá zvířata: 0,03-0,06

TRIAMCINOLONI ACETONIDUM
Farmakologická skupina, použití: hormony (glukokortikoidy)
Dávky:

i.m.	C: 0,2-0,3 mg.kg^{-1}
	F: 0,11-022 mg.kg^{-1} (d.max. 0,5 pro toto)
	E, B, S: 0,02-0,04 mg.kg^{-1}
intraartric.	C, F: 1-3 mg na kloub; E: až 20 mg na kloub

TRIAMTERENUM
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky:

p.o.	C: 1,5-2,5 mg.kg^{-1} (2x denně) (**dosis toxica**: kolem 30 mg.kg^{-1})

TRIMECAINI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: lokální anestetika, antiarytmika
Dávky:
Anestezie

- infiltrační	(0,25-1% roztok)
	Velká zvířata: 75 ml (maximálně 1,5 g)
	Středně velká: 15 ml (S maximálně 0,3 g)
	Malá zvířata: 8 ml
- svodná	(2% roztok)
	Velká zvířata: až 5 ml
	Středně velká a malá: až 3 ml
	(C: maximálně 0,1 g)
	Poznámka: Toxicita stoupá s koncentrací roztoku.
p.o.	ve 2% roztoku obecně: 1 mg.kg^{-1} (antiarytmikum)
i.v.	v 1% roztoku orientačně asi 1,5 mg.kg^{-1} (antiarytmikum)

TUBOCURARINI CHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: myorelaxancia
Dávky:

i.m.	E: 0,015-0,1; C: kolem 0,0045 (při tetanu)
	(**D.L.**: 10 mg.kg^{-1})

UREA
Farmakologická skupina, použití: diuretika
Dávky:

p.o.	E: 50,0-250,0; C: 0,5-15,0
i.v.	30% roztok v 10% roztoku glukózy po kapkách obecně střední dávky: 500-1000 $mg.kg^{-1}$

VERAPAMILI HYDROCHLORIDUM
Farmakologická skupina, použití: antiarytmika
Dávky:

i.v.	(zvolna) C: 0,05 $mg.kg^{-1}$ každých 8 h
p.o.	C: 0,5 $mg.kg^{-1}$ každých 6 hodin

VERATRI ALBI RADIX
Farmakologická skupina, použití: anestetika, hypotenziva, ruminatoria, stomachika
Dávky: p.o. (rozděleně) E: 12,0; B: 15,0; O, Cp, S: 4,0; C: 0,2

VINBLASTINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: cytostatika (leukemie, lymfogranulomatóza)
Dávky: i.v. (zvolna) malá zvířata: 10-100 $\mu g.kg^{-1}$ (po 7 dní)

VINCRISTINI SULFAS
Farmakologická skupina, použití: cytostatika (leukemie, lymfogranulomatóza)
Dávky: i.v. (zvolna) malá zvířata: 25-100 $\mu g.kg^{-1}$

VITAMINUM A (RETINOLI ACETAS)
Farmakologická skupina, použití: vitaminy, karence vitaminu A
Dávky:

p.o.	obecně: 350-700 m.j./kg ž.hm. G: 3 500-70 000 m.j./kg krmiva

6 Speciální část

770 *Absinthii herba*

6.1 Léčivé a pomocné látky

Absinthii herba

N

Pelyňková nať

Synonymum. Herba absinthii

Jsou to usušené celé nebo řezané přízemní listy nebo kvetoucí vrcholky druhu *Artemisia absinthium* L. nebo jejich směs. Obsahuje nejméně 1 ml silice v 1 kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga intenzivního aromatického pachu a intenzivní hořké chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listy zelenošedé až šedozelené, na obou stranách stříbrošedě plstnaté. Přízemní listy ouškatě řapíkaté, v obrysu vejčité, dvakrát až třikrát peřenosečné; úkrojky listu kopinaté až čárkovitě kopinaté. V horní části listy menší, přisedlé, méně dělené, v jednoduché listeny se zmenšující. Stonek v horní části zelenošedý, stříbrošedě plstnatý, rýhovaný, o průměru až 2,5 mm. Květenství uspořádáno v bohatou přímou latu. Úbory kulovité až ploše polokulovité o průměru 2 mm až 4 mm. Zákrov šedě plstnatý, četné žluté terčové oboupohlavné květy jsou asi 2 mm dlouhé, obvodové samičí květy a pentlicovité chlupy jsou asi 1 mm dlouhé.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelenošedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné krycí chlupy, s krátkou jednobuněčnou až pětibuněčnou nohou a na ní kolmo nasazenou velmi dlouhou koncovou buňkou; průduchy anomocytické (*2.8.3*); roztroušeně žláznaté mnohobuněčné chlupy; úlomky oboupohlavních a samičích květů; pylová zrna se třemi klíčními póry; svazky vláken a kolenchymatického pletiva stonku.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 2 g práškované drogy (355) se smíchá s 50 ml vroucí *vody R* a nechá se stát 5 min za občasného protřepávání. Po ochlazení se smíchá s 5 ml roztoku *octanu olovnatého R* (100 g/l) a zfiltruje se. Baňka i filtr se promyjí 20 ml *vody R.* Filtrát se protřepe 50 ml *dichlormethanu R;* organická vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltruje se a na vodní lázni se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *lihu 96% R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do tří bodů (vzdálených vzájemně asi 30 mm) po 10 μl zkoušeného roztoku (chromatogram A, B, a C). Vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *dichlormethanu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Ve střední části chromatogramů A, B a C je intenzivně zbarvená skvrna (artabsin). Mezi jednotlivými chromatogramy se odstraní úzký pruh vrstvy tak, aby chromatogramy byly vzájemně oddělené a postupně se překryjí vhodnou skleněnou deskou. Chromatogram B se postříká roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (620 g/l), chromatogram C se postříká *acetanhydridem v kyselině sírové RS.* Skvrna odpovídající artabsinu na chromatogramech B a C se zbarví modře. Vrstva se suší 20 min při 80 °C za stálého pozorování. Ve střední části chromatogramů B a C je intenzivní skvrna absinthinu; na chromatogramu B je zbarvena

oranžovočerveně, na chromatogramu C červeně až vínově červeně. Na chromatogramech mohou být další slabě zbarvené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Číslo hořkosti. Nejméně 15 000. Provádí se srovnáním s chininiumchloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000. Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění, které chutná ještě hořce.

Základní roztok chininiumchloridu. 0,100 g *chininiumchloridu R* se rozpustí ve 100,0 ml *vody R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 1,00 g práškované drogy (710) se přelije 1000 ml vroucí *vody R* a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, prvních 20 ml filtrátu se odstraní.

Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 4,2 ml základního roztoku chininiumchloridu a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Určí se roztok s nejnižší koncentrací, který chutná ještě hořce. 10,0 ml roztoku nejnižší koncentrace se převaluje v ústech 30 s tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka. Jestliže roztok nechutná hořce vyplivne se a po 1 min se ústa vypláchnou vodou. Po 10 min se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor *k* se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{5,00}{n},$$

v němž značí:

n - počet ml základního roztoku chininiumchloridu, který chutnal ještě hořce.

10/*k* ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 150,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku chutná hořce.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 5 % stonků o průměru více než 4 mm.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*) v 2000ml baňce s 50,0 g drogy a 500 ml *vody R* jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*. Destiluje se nejméně 3 h po vytvoření první kapky silice.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Acaciae gummi

Arabská klovatina

Synonymum. Gummi arabicum

Je to na vzduchu ztvrdlá klovatina vytékající samovolně nebo získaná po naříznutí kmene a větví druhu *Acacia senegal* L. WILLD. a jiných afrických druhů rodu *Acacia.*

Vlastnosti

Droga bez chuti, ulpívá na jazyku. Je velmi zvolna a téměř beze zbytku rozpustná ve dvojnásobném množství vody; rostlinné částice mohou být přítomny jen ve velmi malém množství.

Tekutina (sliz) je bezbarvá nebo nažloutlá, hustá, viskózní, lepivá, průsvitná, na lakmusový papír reaguje kysele. Arabská klovatina je prakticky nerozpustná v lihu 96% a etheru.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Okrouhlé, oválné nebo ledvinovité kousky (kapky) o průměru 1 cm až 3 cm. Jsou nažloutlé, žluté nebo světle jantarové, občas s narůžovělým odstínem, drobivé, neprůhledné, na povrchu často popraskané, snadno se lámající na nepravidelné, bělavé nebo lehce nažloutlé hranaté úlomky, sklovité, průhledné; lom lasturovitý. Ve střední části celých, nerozlámaných kapek občas drobná dutina.

B. Droga se upráškuje. Prášek je bílý nebo nažloutlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (*V/V*). Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: hranaté, nepravidelné, bezbarvé, lesklé úlomky. Mohou být patrny jen stopy škrobu nebo rostlinných tkání. Nejsou přítomny vrstevnaté membrány.

C. Roztok zkoušené látky (100 g/l) je levotočivý.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *křemeliny G R*. Pro přípravu vrstvy se namísto *vody R* použije roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (16 g/l).

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy se smíchá s 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* (40 g/l) a zahřívá se 90 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. 10 ml roztoku se zneutralizuje asi 2 g *uhličitanu barnatého R*; protřepává se 90 min a pak se zfiltruje. 1 ml filtrátu se smíchá s 9 ml *methanolu R* a odstřeďuje se.

Porovnávací roztok. 10 mg *arabinosy R*, 10 mg *glukosy R*, 10 mg *galaktosy R* a 10 mg *rhamnosy R* se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (16 g/l), *1-butanolu R* a *acetonu R* (10 + 40 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se suší několik minut v proudu horkého vzduchu a vyvíjí se ještě jednou, za výše uvedených podmínek po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min při 110 °C, postříká se *zkoumadlem aminohippurovým R* a zahřívá se 10 min při 110 °C. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrné čtyři zřetelně oddělené barevné skvrny odpovídající galaktose (žlutohnědá), glukose (žlutohnědá), arabinose (červenohnědá) a rhamnose (žlutá) v pořadí vzrůstajícího R_F. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrny tři skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám galaktosy, arabinosy a rhamnosy; není patrna skvrna odpovídající glukose a ani žádné další skvrny, zejména v horní části chromatogramu.

E. 1 g práškované drogy se rozpustí ve 2 ml *vody R* a smíchá se s 2 ml *lihu 96% R*. Po protřepání vznikne bílý, želatinózní sliz; po přidání 10 ml *vody R* vznikne tekutina.

F. Roztok zkoušené látky (1 : 10 000) se smíchá s *octanem olovnatým zásaditým RS*; po několika minutách vzniká sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 3,0 g práškované drogy se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 30 ml.

Nerozpustné látky. 5,0 g práškované drogy se smíchá se 100 ml *vody R* a 14 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, mírně se vaří 15 min za častého protřepávání. Ještě horký roztok se filtruje předem zváženým filtrem ze slinutého skla. Filtr se promyje horkou *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 25 mg (0,5 %).

Agar a tragant. 2 ml roztoku S se smíchají s 8 ml *vody R* a 0,2 ml *octanu olovnatého RS*. Po protřepání nevznikne zákal.

0,1 g práškované drogy se smíchá s 1 ml *jodu 0,01 mol/l VS*; nevznikne červené nebo olivově zelené zbarvení.

Agar a slizy z rostlin rodu Sterculia. 50 mg práškované drogy se smíchá s 0,2 ml čerstvě připravené *červeně rutheniové RS*. Při pozorování pod mikroskopem nejsou patrny po přidání *vody R* žádné červeně zbarvené útvary.

Škrob a dextrin. 10 ml roztoku S se zahřeje k varu, po ochlazení se přidá 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l-VS*; nevznikne modré nebo hnědočervené zbarvení.

Sacharosa a fruktosa. 1 ml roztoku S se smíchá se 4 ml *vody R*, 0,1 g *resorcinolu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 1 min na vodní lázni; nevznikne žluté nebo růžové zbarvení.

Třísloviny. 10 ml roztoku S se smíchá s 0,1 ml *chloridu železitého RS1*; vznikne želatinózní sraženina, ale ani sraženina ani roztok se nezbarví tmavě modře.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %; 1,000 g práškované drogy se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 4,0 %.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^4 živých aerobních mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou (*2.6.12*). Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* (*2.6.13*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Acaciae gummi dispersione desiccatum

Arabská klovatina usušená rozprášením

Získává se sušením roztoku arabské klovatiny v rozprašovací sušárně.

Vlastnosti

Vyhovuje požadavkům článku *Acaciae gummi*. Je úplně a rychle rozpustná ve dvojnásobném množství vody.

Zkoušky totožnosti

Pozoruje se pod mikroskopem v *lihu 96%*. Zkoušená látka je tvořena převážně kulovitými částicemi o průměru 4 μm až 40 μm; uprostřed s dutinou z jedné nebo několika vzduchových bublin; několik minut jsou patrny ploché úlomky. V polarizovaném světle není patrný černý kříž. Nejsou patrny rostlinné tkáně.

Vyhovuje též Zkouškám totožnosti C, D, E a F článku *Acaciae gummi*.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám na čistotu článku *Acaciae gummi*. Zkouška Nerozpustné látky se neprovádí. Zkouška Ztráta sušením se upravuje takto:

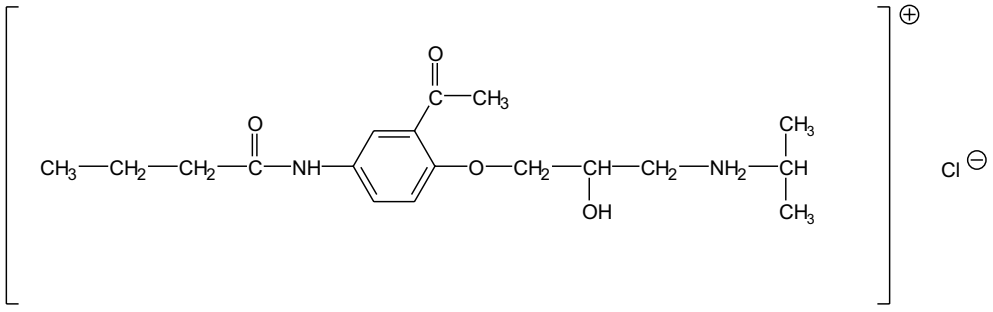
Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %. 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Acebutololi hydrochloridum

Acebutololiumchlorid



$C_{18}H_{29}ClN_2O_4$ M_r 372,89 CAS 34381-68-5

Je to(*RS*)-N-isopropyl-N-{[3-(2-acetyl-4-butyrylaminofenoxy)-2-hydroxy]propyl}amonium-chlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{29}ClN_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 143 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,1% (*V/V*) a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 233 nm a při 322 nm. Specifická absorbance v maximu při 233 nm je 555 až 605.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *acebutololiumchloridu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného pro chromatografii s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *acebutololiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *pindololu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny chloristé R*, *methanolu R* a *vody R* (0,5 + 40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,20 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití dvou vrstev *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 3 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 15 ml.

A. Na první vrstvu se nanese odděleně po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *1-butanolu R* a *vody R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm.
B. Na druhou vrstvu se nanese odděleně po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-propanolu R* (10 + 90) po dráze 15 cm.

Vrstvy se vysuší na vzduchu a pozorují se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramech zkoušeného roztoku (A i B) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Nepřihlíží se ke skvrnám na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

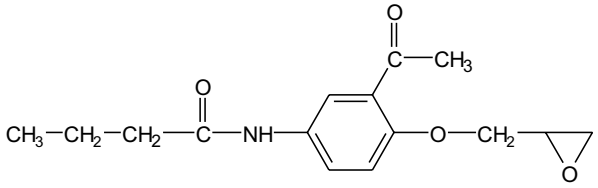
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,29 mg $C_{18}H_{29}ClN_2O_4$.

Uchovávání

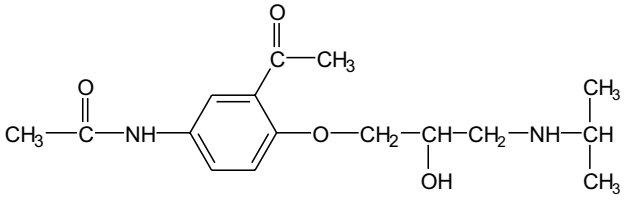
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

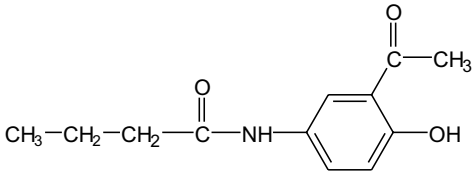
Nečistoty



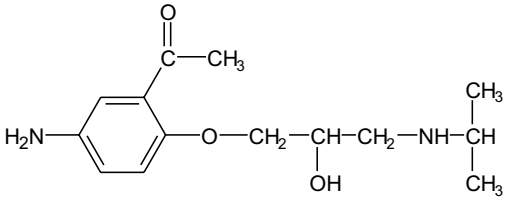
A. 3′-acetyl-4′-(2,3-epoxypropoxy)butyranilid,



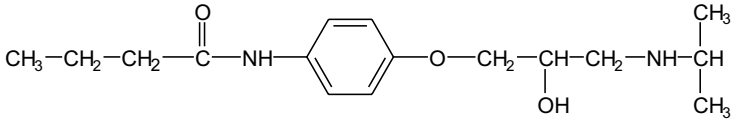
B. 3′-acetyl-4′-[2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]acetanilid (diacetolol),



C. 3′-acetyl-4′-hydroxybutyranilid,



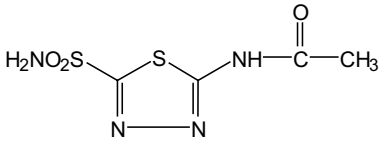
D. 5′-amino-2′-[2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]acetofenon,



E. 4′-[2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]butyranilid.

† Acetazolamidum

Acetazolamid



$C_4H_6N_4O_3S_2$ M_r 222,24 CAS 59-66-5

Je to 5-acetamido-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_6N_4O_3S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 30,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,01 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml (roztok a). Měří se absorbance roztoku (a) *(2.2.25)* při 230 nm až 260 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 240 nm a specifická absorbance v maximu je 162 až 176. 25,0 ml roztoku (a) se zředí stejným rozpou-

štědlem na 100,0 ml a měří se absorbance při 260 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 292 nm a specifická absorbance v maximu je 570 až 620.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *acetazolamidu CRL*. Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka i referenční látka v *lihu 96% R*, roztoky se odpaří do sucha a znovu se zaznamenají spektra tablet obou látek.

C. Asi 20 mg se smíchá ve zkumavce se 4 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a s 0,2 g *zinku práškového R*. K ústí zkumavky se přiloží *papír s octanem olovnatým R*; papír se zbarví hnědočerně.

D. Asi 25 mg se rozpustí ve směsi 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *síranu měďnatého RS*; vznikne zelenomodrá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ nebo $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *ethylacetatu R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se smíchá se směsí stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *ethylacetatu R* a zředí se jí na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se v komoře nevyložené filtračním papírem a sycené 1 h čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethylacetatu R* a *2-propanolu R* (20 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Sírany *(2.4.13)*. K 0,4 g se přidá 20 ml *vody destilované R* a zahřátím k varu se rozpustí. Směs se za častého míchání ochladí a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 25 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

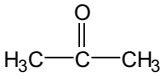
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,22 mg $C_4H_6N_4O_3S_2$.

Uchovávání

Separandum.

Acetonum

Aceton



C_3H_6O M_r 58,08 CAS 67-64-1

Je to 2-propanon.

Vlastnosti

Těkavá čirá bezbarvá kapalina. Je mísitelný s vodou, s lihem 96% a s etherem. Jeho páry jsou zápalné.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml roztoku zkoušené látky 0,5% *(V/V)* se přidá 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (10 g/l), 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a malý přebytek *kyseliny octové R*. Vznikne intenzivní červené zbarvení, které se po zředění *vodou R* změní na fialové.

B. K 10 ml roztoku zkoušené látky 0,1% *(V/V)* v *lihu R* 50% *(V/V)* se přidá 1 ml roztoku *nitrobenzaldehydu R* (10 g/l) ve stejném rozpouštědle a 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. Nechá se asi 2 min stát a potom se okyselí *kyselinou octovou R*; vznikne zelenomodré zabarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. K 10 ml se přidá 10 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5 ml se přidá 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 0,15 ml *fenolftaleinu RS* a 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je růžový. Přidá se 0,7 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 0,05 ml *červeně methylové RS*; roztok je červený nebo oranžový.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,790 až 0,793.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. Zkoušená látka.
Porovnávací roztok. K 0,5 ml *methanolu R* se přidá 0,5 ml *2-propanolu R* a zředí se zkoušeným roztokem na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušeným roztokem na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kolony délky 50 m a vnitřního průměru 0,3 mm se stěnou pokrytou vrstvou (0,5 μm) *makrogolu 20 000 R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při dělicím poměru asi 50 : 1 a lineární průtokové rychlosti 21 cm/s,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 45 °C do nástřiku, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min na 100 °C, teplota nástřikového prostoru je 150 °C a teplota detektoru 250 °C. Nastřikuje se 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku.

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek eluují látky v tomto pořadí: aceton, methanol, 2-propanol.

Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času acetonu, který je asi 5,3 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píky methanolu a 2-propanolu nejméně 1,0.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku: plocha žádného píku odpovídajícího methanolu nebo 2-propanolu není větší než rozdíl mezi plochami odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku a plochami odpovídajících píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (0,05 % *V/V* pro každou nečistotu); plocha žádného píku, kromě hlavního píku, píku odpovídajícího methanolu a píku odpovídajícího 2-propanolu, není větší než rozdíl mezi plochou píku methanolu na chromatogramu porovnávacího roztoku a plochou odpovídajícího píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (0,05 % *V/V* pro každou další nečistotu).

Látky nerozpustné ve vodě. K 1 ml se přidá 19 ml *vody R*; roztok je čirý *(2.2.1)*.

Redukující látky. K 30 ml se přidá 0,1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a nechá se stát 2 h ve tmě; směs se zcela neodbarví.

Zbytek po odpaření. 20,0 g se odpaří na vodní lázni do sucha a potom se suší při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1 mg (50 μg/g).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3 g/l. Stanoví se s 10,0 ml zkoušené látky za použití 20 ml *pyridinu bezvodého R* jako rozpouštědla.

Uchovávání

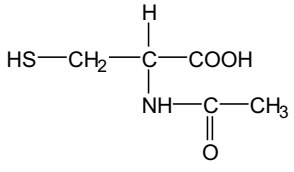
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

A. methanol,
B. 2-propanol.

Acetylcysteinum

Acetylcystein



$C_5H_9NO_3S$ M_r 163,19 CAS 616-91-1

Je to kyselina (*R*)-2-acetamido-3-merkaptopropionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_9NO_3S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 104 °C až 110 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *acetylcysteinu CRL*. Tablety se připraví za použití *bromidu draselného R*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas a velikost hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) jsou přibližně shodné s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

E. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,05 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) a 0,05 ml *amoniaku 26% R*; vznikne tmavě fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,0 až 2,8; měří se roztok připravený smícháním 2 ml roztoku S s 8 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +21,0° až +27,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se následující roztok: ve 25ml odměrné baňce se smíchá 1,25 g zkoušené látky s 1 ml roztoku *edetanu disodného R* (10 g/l), přidá se 7,5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a promíchá se. Po rozpuštění se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,0 (2)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Použijí se čerstvě připravené roztoky, pokud není předepsáno jinak.*

Zkoušený roztok (a). 0,80 g se suspenduje v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (c). Použije se zkoušený roztok (a) nejméně po 1 h stání.
Porovnávací roztok (a). 4,0 mg *acetylcysteinu CRL*, 4,0 mg *L-cystinu R*, 4,0 mg *L-cysteinu R*, 4,0 mg *N,N-diacetyl-L-cystinu CRL* a 4,0 mg *N,S-diacetyl-L-cysteinu CRL* se suspenduje v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 4,0 mg *acetylcysteinu CRL* se suspenduje v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),

- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (3 + 97) a jejíž hodnota pH byla upravena *kyselinou fosforečnou R* na 3,0. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy následující: L-cystinu asi 2,2 min, L-cysteinu asi 2,4 min, 2-methyl-2-thiazolin-4-karboxylové kyseliny vzniklé ve zkoušeném roztoku (c) asi 3,3 min, acetylcysteinu asi 6,4 min, N,N-diacetyl-L-cystinu asi 12 min, N,S-diacetyl-L-cysteinu asi 14 min. Nastříkne se 20 μl roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je rozlišení mezi píky L-cystinu a L-cysteinu nejméně 1,5 a rozlišení mezi píky N,N-diacetyl-L-cystinu a N,S-diacetyl-L-cysteinu nejméně 2,0.

Nastříkne se 20 μl *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* jako slepá zkouška. Odděleně se nastříkne 20 μl porovnávacího roztoku (a), 20 μl porovnávacího roztoku (b) a 20 μl každého zkoušeného roztoku. Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 5násobku retenčního času acetylcysteinu, který je asi 30 min.

Z chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se vypočítá procentuální obsah známých a neznámých nečistot podle následujících vzorců:

$$\textit{známé nečistoty} = \frac{A_1 \,.\, m_2 \,.\, 100}{A_2 \,.\, m_1},$$

$$\textit{neznámé nečistoty} = \frac{A_3 \,.\, m_3 \,.\, 100}{A_4 \,.\, m_1},$$

v nichž značí:

A_1 - plochu píku jednotlivé nečistoty (L-cystin, L-cystein, N,N-diacetyl-L-cystin a N,S-diacetyl-L--cystein) na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

A_2 - plochu píku jednotlivé nečistoty (L-cystin, L-cystein, N,N-diacetyl-L-cystin, N,S-diacetyl-L--cystein) na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),

A_3 - plochu píku neznámé nečistoty na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

A_4 - plochu píku acetylcysteinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b),

m_1 - hmotnost zkoušené látky ve zkoušeném roztoku (a),

m_2 - hmotnost jednotlivé nečistoty v porovnávacím roztoku (a),

m_3 - hmotnost acetylcysteinu v porovnávacím roztoku (b).

Procentuální obsah jednotlivé známé a jednotlivé neznámé nečistoty není větší než 0,5 %. Celkový obsah známých a neznámých nečistot není větší než 0,5 %. Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla, k píku s retenčním časem asi 3,3 min odpovídajícímu kyselině 2-methyl-2-thiazolin-4--karboxylové a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Zinek. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.

Porovnávací roztoky. Porovnávací roztoky se připraví za použití základního *roztoku zinku (5 mg Zn/ml)* zředěného *kyselinou chlorovodíkovou 0,001 mol/l RS*.

Změří se absorbance při 213,8 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, plamene vzduch-acetylen a korekčního postupu pro nespecifickou absorpci.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h ve vakuové sušárně při 70 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,140 g se rozpustí v 60 ml *vody R* a přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Po ochlazení v ledové vodě se přidá 10 ml *jodidu draselného RS* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

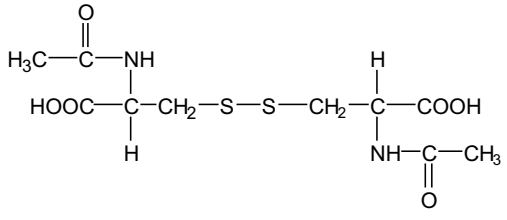
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 16,32 mg $C_5H_9NO_3S$.

Uchovávání

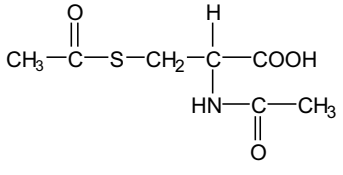
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

A. L-cystin,
B. L-cystein,



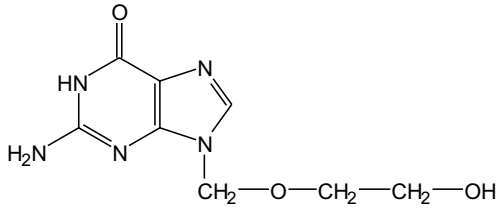
C. N,N-diacetyl-L-cystin,



D. N,S-diacetyl-L-cystein.

† Aciclovirum

Aciklovir



$C_8H_{11}N_5O_3$ M_r 225,21 CAS 59277-89-3

Je to 2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methy]-1,9-dihydro- -6*H*-purin-6-on. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{11}N_5O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylsulfoxidu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích minerálních kyselin a alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *acikloviru CRL*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 25 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R. Roztoky se připravují těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *dimethylsulfoxidu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *acikloviru nečistoty A CRL* se rozpustí v *dimethylsulfoxidu R* a zředí se jím na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *dimethylsulfoxidem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku, vysuší se v proudu teplého vzduchu a po ochlazení se vrstva vyvíjí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 20 + 80) po dráze 10 cm. Potom se vrstva vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světlem při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku o R_F vyšším než hlavní skvrna není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (20 + 80) a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *acikloviru CRL* a 20 mg *acikloviru nečistoty A CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (20 + 80) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 7 mg *guaninu R* se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,10 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min připravené takto: 6,0 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* a 1,0 g *dekansulfonanu sodného R* se rozpustí v 900 ml *vody R* a upraví se hodnota pH na 3 ± 0,1 *kyselinou fosforečnou R*. Přidá se 40 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se po 20 µl každého roztoku a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 7násobku retenčního času acikloviru. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) počet teoretických pater, počítáno pro pík acikloviru nečistoty A, je nejméně 1500 a jeho kapacitní poměr je nejméně 7 (počítáno V_0 z píku odpovídajícího kyselině octové). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího guaninu není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,7 %). Plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího guaninu, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího guaninu, není větší než 2násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,05násobku plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 6,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

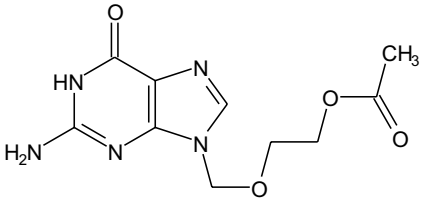
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,52 mg $C_8H_{11}N_5O_3$.

Uchovávání

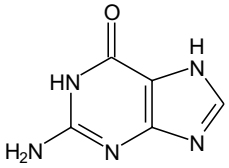
V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

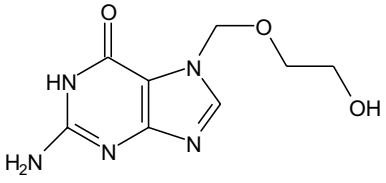
Nečistoty



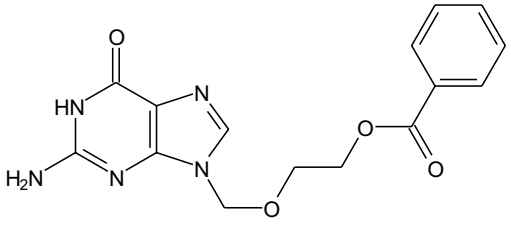
A. 2-amino-9-{[2-(acetyloxy)ethoxy]methyl}-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on,



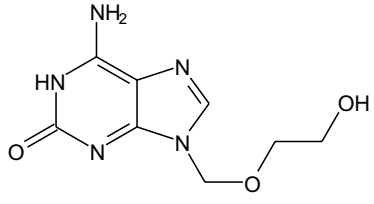
B. 2-amino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on,



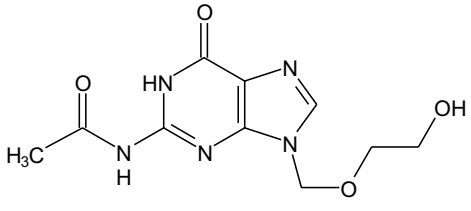
C. 2-amino-7-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on,



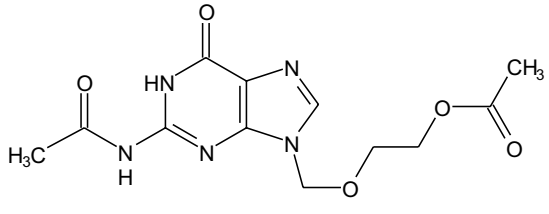
D. 2-amino-9-{[2-(benzoyloxy)ethoxy]methyl}-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on,



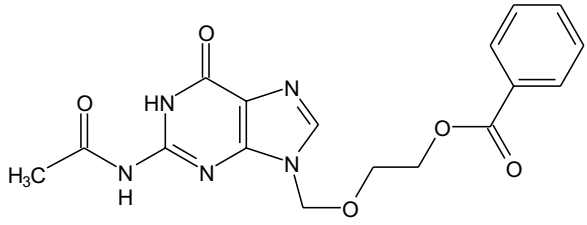
E. 6-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,3-dihydro-2*H*-purin-2-on,



F. N-acetyl-2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on,



G. N-acetyl-2-amino-9-{[2-(acetyloxy)ethoxy]methyl}-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on,

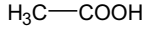


H. N-acetyl-2-amino-9-{[2-(benzoyloxy)ethoxy]methyl}-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on.

† Acidum aceticum 99%

Kyselina octová 99%

Synonyma. Acidum aceticum concentratum, ledová kyselina octová, Acidum aceticum glaciale



$C_2H_4O_2$ M_r 60,05 CAS 64-19-7

Je to kyselina ethanová. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_2H_4O_2$.

Vlastnosti

Krystalická hmota nebo čirá bezbarvá těkavá kapalina. Je mísitelná s vodou, s lihem 96%, s etherem a s dichlormethanem.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok (100 g/l) je silně kyselý *(2.2.4)*.

B. K 0,03 ml se přidají 3 ml *vody R* a neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Roztok vyhovuje zkoušce (b) na octany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 20 ml se zředí *vodou destilovanou R* na 100 ml.

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a bezbarvá *(2.2.2, Metoda II)* kapalina.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. Nejméně 14,8 °C.

Redukující látky. K 5,0 ml se přidá 10,0 ml *vody R* a promíchá se. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 6 ml *kyseliny sírové R* a po ochlazení se přidají 2,0 ml *dichromanu draselného 0,167 mol/l VS*. Roztok se nechá stát 1 min a pak se přidá 25 ml *vody R* a 1 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l). Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1,0 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Spotřebuje se nejméně 1,0 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (25 μg/ml).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/ml).

Železo *(2.4.9)*. 5,0 ml roztoku (a) získaného při zkoušce Těžké kovy se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (5 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. Zbytek získaný při zkoušce Zbytek po odpaření se rozpustí zahřátím ve dvakrát 15 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml (roztok a). 12 ml roztoku (a) vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (5 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Zbytek po odpaření. 20 g se odpaří na vodní lázni do sucha a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Odparek váží nejvýše 2,0 mg (0,01 %).

Stanovení obsahu

Kuželová baňka se zabroušenou zátkou obsahující 25 ml *vody R* se zváží, přidá se 1,0 ml zkoušené látky a opět se zváží. Pak se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 60,1 mg $C_2H_4O_2$.

Uchovávání

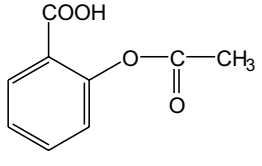
V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

Acidum acetylsalicylicum

Kyselina acetylsalicylová

Synonymum. Acidum acetylosalicylicum



$C_9H_8O_4$ M_r 180,16 CAS 50-78-2

Je to kyselina 2-acetoxybenzoová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_8O_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96%, dobře rozpustná v etheru.

Taje při asi 143 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny acetylsalicylové CRL.*

B. K 0,2 g se přidají 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a roztok se 3 min vaří. Po ochlazení se přidá 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Vyloučená krystalická sraženina se odfiltruje, promyje a vysuší při 100 °C až 105 °C. Teplota tání *(2.2.14)* je 156 °C až 161 °C.

C. 0,1 g se promísí ve zkumavce s 0,5 g *hydroxidu vápenatého R.* Směs se zahřívá a vyvíjí se páry, které zbarví filtrační papír navlhčený 0,05 ml *nitrobenzaldehydu RS* žlutozeleně nebo modrozeleně. Zbarvení papíru se po zvlhčení *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* změní na modré.

D. Asi 20 mg sraženiny ze zkoušky B se zahřátím rozpustí v 10 ml *vody R* a ochladí se. Tento roztok vyhovuje zkoušce na salicylany *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 9 ml *lihu 96% R.* Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Asi 0,1 %, počítáno jako kyselina acetylsalicyloylsalicylová. 0,15 g se rozpustí v 100ml odměrné baňce v 10 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu v propanolu 0,1 mol/l RS.* Po 10 min se přidá 8,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a 20,0 ml roztoku *tetraboritanu sodného R* (19 g/l) a promíchá se. Potom se za stálého míchání přidají 2,0 ml roztoku *aminopyrazolonu R* (10 g/l) a 2,0 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (10 g/l) a za 2 min se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Po 20 min se měří absorbance *(2.2.25)* při 505 nm ve 2cm kyvetě proti *vodě R* jako kontrolní tekutině. Absorbance není vyšší než 0,25.

Kyselina salicylová. Nejvýše 500 μg/g. 0,10 g se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R,* přidá se 15 ml ledové *vody R* a 0,05 ml roztoku *chloridu železitého R* (5 g/l). Tento roztok se do 1 min nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně přidáním směsi obsahující 0,05 ml roztoku *chloridu železitého R* (5 g/l), 0,1 ml *kyseliny octové R,* 4 ml *lihu 96% R* a 15 ml *vody R* k 1 ml roztoku obsahujícímu 5,0 mg *kyseliny salicylové R* ve 100 ml *lihu 96% R.*

Těžké kovy *(2.4.8).* 0,75 g se rozpustí v 9 ml *acetonu R* a zředí se *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok olova (1 μg Pb/ml) se připraví zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (6 + 9).

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí v baňce se zabroušenou zátkou v 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 50,0 ml *hydroxidu sodného 0,5 mol/l VS.* Baňka se uzavře a nechá se stát 1 h. Potom se přidá 0,2 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS.* Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,5 mol/l VS* odpovídá 45,04 mg $C_9H_8O_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Acidum alginicum

Kyselina alginová

CAS 9005-32-7

Je to lineární polymer proměnlivých podílů kyseliny β-(1→4)-D-mannuronové a α-(1→4)-L--guluronové. Získává se především z řas rodu *Phaeophyceae*. Malý podíl karboxylových skupin může být neutralizován. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 19,0 % až 25,0 % karboxylových skupin (COOH).

Vlastnosti

Bílý až slabě žlutohnědý krystalický nebo amorfní prášek. Je velmi těžce rozpustná nebo prakticky nerozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v organických rozpouštědlech. Ve vodě bobtná, ale nerozpouští se; rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,2 g se přidá 20 ml *vody R* a 0,5 ml *uhličitanu sodného RS*. Směs se protřepe a zfiltruje. K 5 ml filtrátu se přidá 1 ml *chloridu vápenatého RS*; vznikne objemná gelovitá hmota.

B. K 5 ml filtrátu získaného ve zkoušce A se přidá 0,5 ml roztoku *síranu hořečnatého R* (123 g/l); objemná gelovitá hmota se nevytvoří.

C. K 5 mg se přidá 5 ml *vody R*, 1 ml čerstvě připraveného roztoku *1,3-dihydroxynaftalenu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Mírně se 3 min vaří, ochladí se, přidá se 5 ml *vody R* a protřepe se s 15 ml *diisopropyletheru R*. Současně se provede slepá zkouška. Horní vrstva získaná se zkoušenou látkou je výrazněji modravě červeně zbarvena než horní vrstva u slepé zkoušky.

Zkoušky na čistotu

Chloridy. Nejvýše 1,0 %. K 2,50 g se přidá 50 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 1 h se protřepává, zředí se *kyselinou dusičnou zředěnou RS* na 100,0 ml a zfiltruje se. K 50,0 ml filtrátu se přidá 10,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 5 ml *toluenu R* a titruje se za intenzivního protřepávání *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,545 mg Cl.

Těžké kovy. 1,0 g se smíchá s 0,5 g *oxidu hořečnatého R1* a žíhá se při zahřátí kelímku do slabě červené barvy, dokud se nezíská homogenní bílá nebo našedlá hmota. Jestliže směs i po 30 min žíhání zůstane zbarvená, ochladí se, směs se promíchá skleněnou tyčinkou a žíhání se opakuje. Je-li to nutné, postup se opakuje. Pak se zahřívá asi 1 h při teplotě 800 °C. Zbytek se převede do dvakrát 5 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*. Tento roztok

se 2 min vytřepává 25 ml *isobutylmethylketonu R* a vrstvy se nechají oddělit. Spodní vrstva se odpaří na vodní lázni do sucha, zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. Je-li potřeba, roztok se zfiltruje (konečný roztok zkoušené látky). K 12 ml takto získaného roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a promíchá se. Pak se přidá 1,2 ml *thioacetamidu RS* a ihned se promíchá. Po 2 min není hnědé zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně takto:

K 0,5 g *oxidu hořečnatého R1* se přidají 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*, směs se vysuší v sušárně při 100 °C až 105 °C. Žíhání, převední do *kyseliny chlorovodíkové R*, protřepávání s *isobutylmethylketonem R*, oddělení vrstev a odpaření spodní vrstvy do sucha se provede stejným způsobem jako u zkoušené látky. Zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml konečného roztoku zkoušené látky a 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5*. Promíchá se, přidá se 1,2 ml *thioacetamidu RS* a opět se promíchá (20 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 15,0 %; 0,1000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 8,0 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^2 živých aerobních mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce *(2.6.13)* na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella*.

Stanovení obsahu

K 0,2500 g se přidá 25 ml *vody R*, 25,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a 0,2 ml *fenolftaleinu RS*. Titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS*.

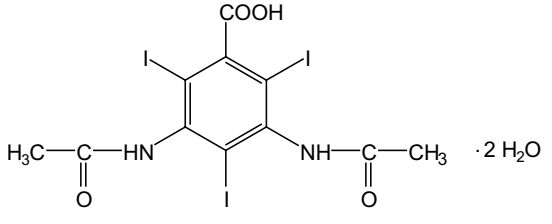
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,502 mg karboxylových skupin (COOH).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Acidum amidotrizoicum dihydricum

Dihydrát kyseliny amidotrizoové



$C_{11}H_9I_3N_2O_4 \cdot 2H_2O$ M_r 649,95 CAS 50978-11-5

Je to dihydrát kyseliny 3,5-bis(acetamido)-2,4,6-trijodbenzoové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_9I_3N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dihydrátu kyseliny amidotrizoové CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

C. 50 mg se mírně zahřeje v malé porcelánové misce nad otevřeným plamenem; vyvíjejí se fialové páry.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *hydroxidu sodném zředěném RS* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v roztoku *amoniaku 17,5% R* 3% *(V/V)* v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *amoniaku 17,5% R* 3% *(V/V)* v *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí roztokem *amoniaku 17,5% R* 3% *(V/V)* v *methanolu R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *dihydrátu kyseliny amidotrizoové CRL* se rozpustí v roztoku *amoniaku 17,5% R* 3% *(V/V)* v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí *kyseliny mravenčí bezvodé R, 2-butanonu R, toluenu R* (20 + 25 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší do vytěkání rozpouštědel a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %).

Halogenidy. 0,55 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 15 ml *vody R*, potom se přidá 6 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy *(2.4.4)* (150 μg/g, vyjádřeno jako chloridy).

Volné aromatické aminy. *Roztoky a zkoumadla se udržují v ledové vodě a chrání se před přímým světlem*. 0,50 g se naváží do 50ml odměrné baňky, přidá se 15 ml *vody R*, protřepe se, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a ochladí se v ledové *vodě*. K ochlazené směsi se přidá 5 ml čerstvě připraveného roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l) a 12 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Opatrně se protřepe a nechá se stát přesně 2 min po přidání *kyseliny chlorovodíkové*. Potom se přidá 10 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l). Nechá se 5 min stát za občasného protřepání, pak se přidá 0,15 ml roztoku *1-naftolu R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, protřepe se a nechá se

stát dalších 5 min. Potom se přidá 3,5 ml *tlumivého roztoku o pH 10,9*, promíchá se a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Absorbance roztoku *(2.2.25)* při 485 nm měřená do 20 min po přípravě proti kontrolní tekutině připravené současně za stejných podmínek bez zkoušené látky je nejvýše 0,30.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 4,5 % až 7,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,150 g ve 250ml varné baňce se přidá 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 20 ml *vody R*, 1 g *zinku práškového R* a několik varných kuliček. Směs se vaří 30 min pod zpětným chladičem, pak se ochladí a chladič se promyje 20 ml *vody R*, které se přidají do baňky. Obsah baňky se zfiltruje a filtr se promyje několikrát *vodou R*. Ke spojenému filtrátu s promývací tekutinou se přidá 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a ihned se titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* a za použití vhodného systému elektrod, např. stříbrné-merkurosulfatové elektrody.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,47 mg $C_{11}H_9I_3N_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

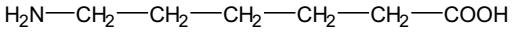
Nečistoty

A. kyselina 5-acetamido-3-amino-2,4,6-trijodbenzoová.

---

† Acidum aminocaproicum

Kyselina aminokapronová



$C_6H_{13}NO_2$ M_r 131,17 CAS 60-32-2

Je to kyselina 6-aminohexanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{13}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96 %, prakticky nerozpustná v etheru.

Taje při asi 205 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny aminokapronové CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,5 g se rozpustí ve 4 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody R*. Odpaří se do sucha zahříváním na vodní lázni a zbytek se vysuší v exsikátoru. Zbytek se rozpustí asi ve 2 ml vroucího *ethanolu R*, ochladí se a nechá se 3 h při 4 °C až 8 °C. Potom se zfiltruje za sníženého tlaku, zbytek se promyje asi 10 ml *acetonu R* a suší se 30 min při 60 °C. Zbytek taje *(2.2.14)* při 131 °C až 133 °C.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 0,5 ml *vody destilované R*, přidají se 3 ml *dimethylformamidu R*, 2 ml *kyseliny askorbové RS* a směs se zahřívá na vodní lázni; vznikne oranžové zabarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)* a zůstává čirý *(2.2.1)* po 24 h stání.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 8,0; měří se roztok S.

Absorbance *(2.2.25)*.

A. Absorbance roztoku S měřená při 287 nm není větší než 0,10 a při 450 nm není větší než 0,03.

B. 2,0 g se převedou do stejnoměrné vrstvy v mělké misce o průměru 9 cm. Miska se přikryje a nechá se stát při 98 °C až 102 °C po dobu 72 h. Potom se obsah misky rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Absorbance tohoto roztoku měřená při 287 nm je nejvýše 0,15 a při 450 nm je nejvýše 0,03.

Látky reagující s ninhydrinem. Stanoví se tenkovrstvou chromatografií *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *kyseliny aminokapronové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *kyseliny aminokapronové CRL* a 10 mg *leucinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku, usuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se při 100 °C až 105 °C po dobu 15 min. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny modrofialového zbarvení na modrozelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,12 mg $C_6H_{13}NO_2$.

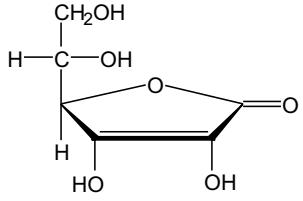
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Acidum ascorbicum

Kyselina askorbová

Synonymum. Vitamin C



$C_6H_8O_6$ M_r 176,13 CAS 50-81-7

Je to (5*R*)-5-[(*S*)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2(5*H*)-furanon. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_6H_8O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a prakticky nerozpustná v etheru.

Taje při asi 190 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a ihned se jí zředí na 100,0 ml. K 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* se přidá 1,0 ml tohoto roztoku a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku ihned po zředění v maximu při 243 nm. Specifická absorbance v maximu je 545 až 585.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety obsahující 1 mg zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny askorbové CRL* měřené za stejných podmínek.

C. Hodnota pH *(2.2.3)* roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, je 2,1 až 2,6.

D. K 1 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,2 ml *dusičnanu stříbrného RS2*; vznikne šedá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +20,5° až +21,5°; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě R* a zředěný stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Kyselina šťavelová. Nejvýše 0,2 %.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v 5 ml *vody R*. Tento roztok se neutralizuje na *papír lakmusový červený R hydroxidem sodným zředěným RS* a poté se přidá 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 0,5 ml *chloridu vápenatého RS*.
Porovnávací roztok. 70 mg *kyseliny šťavelové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 0,5 ml *chloridu vápenatého RS*.

Oba roztoky se nechají stát 1 h. Opalescence zkoušeného roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku.

Měď. Nejvýše 5 μg/g; stanoví se absorpční atomovou spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí v *kyselině dusičné 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky obsahující 0,2 μg Cu/ml, 0,4 μg Cu/ml a 0,6 μg Cu/ml zředěním základního *roztoku mědi (10 μg Cu/ml) kyselinou dusičnou 0,1 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 324,8 nm za použití měděné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen. Nula na přístroji se nastaví za použití *kyseliny dusičné 0,1 mol/l RS*.

Železo. Nejvýše 2 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí v *kyselině dusičné 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky obsahující 0,2 μg Fe/ml, 0,4 μg Fe/ml a 0,6 μg Fe/ml zředěním základního *roztoku železa (20 μg Fe/ml) kyselinou dusičnou 0,1 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 248,3 μm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen. Nula na přístroji se nastaví za použití *kyseliny dusičné 0,1 mol/l RS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 20 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 80 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 1 ml *škrobu RS* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do vzniku trvalého fialově modrého zbarvení.

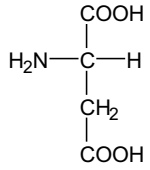
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 8,81 mg $C_6H_8O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených nekovových obalech, chráněna před světlem.

Acidum asparticum

Kyselina asparagová



$C_4H_7NO_4$ M_r 133,10 CAS 56-84-8

Je to kyselina (*S*)-2-aminobutandiová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_4H_7NO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných roztocích minerálních kyselin.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Suspenze 1,0 g zkoušené látky v 10 ml *vody R* je silně kyselá *(2.2.4)*.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny asparagové CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +24,0° až +26,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,000 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v 2 ml *amoniaku 17,5% RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *kyseliny asparagové CRL* se rozpustí ve 2 ml *amoniaku zředěného RS1* a zředí se *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *kyseliny asparagové CRL* a 10 mg *kyseliny glutamové CRL* se rozpustí ve 2 ml *amoniaku zředěného RS1* a zředí se *vodou R* na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku, nechá se na vzduchu vysušit a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká *ninhydrinem RS* a potom se zahřívá 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g), bez dalšího přidání *kyseliny dusičné zředěné RS*.

Sírany *(2.4.13)*. 0,50 g se rozpustí ve 4 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok po 30 min stání vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se dvě hodinová sklíčka o průměru 60 mm a umístí se těsně u sebe. Na vnitřní stranu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm zvlhčený několika kapkami *vody R*. Na spodní sklíčko se umístí 50 mg upráškované zkoušené látky suspendované v 0,5 ml *vody R*. K suspenzi se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R*, směs se rychle promíchá skleněnou tyčinkou, okamžitě se obě sklíčka spojí a zahřívají se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není zbarven intenzivněji modře než papír lakmusový u porovnávacího vzorku, připraveného současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4 /ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. V dělicí nálevce se rozpustí 1,0 g v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a 3 min se třepe. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí mírným zahřátím v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Po ochlazení se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na modré.

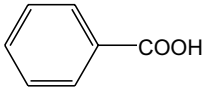
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,31 mg $C_4H_7NO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Acidum benzoicum

Kyselina benzoová



$C_7H_6O_2$ M_r 122,12 CAS 65-85-0

Je to kyselina benzenkarboxylová. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_7H_6O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, bez pachu nebo s velmi slabým charakteristickým pachem. Je těžce rozpustná ve vodě, dobře rozpustná ve vroucí vodě, snadno rozpustná v lihu 96%, v etheru a v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 121 °C až 124 °C.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na benzoany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Zuhelnitelné látky. 0,5 g se rozpustí třepáním v 5 ml *kyseliny sírové R*. Po 5 min není roztok intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Oxidovatelné látky. 0,2 g se rozpustí v 10 ml vroucí *vody R*, ochladí se, protřepe se a zfiltruje. K filtrátu se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,2 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS*. Po 5 min je roztok zbarven růžově.

Halogenované složky a halogenidy. *Všechny použité skleněné nádoby musí být prosté halogenidů, čehož se dosáhne promytím roztokem kyseliny dusičné R (500 g/l), opláchnutím vodou R a*

uchováváním nádob naplněných vodou R. Doporučuje se, aby skleněné nádoby byly vyhrazeny jen pro tuto zkoušku.

Roztok (a). 6,7 g se rozpustí ve směsi 40 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 50 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 7,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,125 g *niklu Raneyova R* a 10 min se zahřívá na vodní lázni. Po ochlazení na pokojovou teplotu se zfiltruje do 25ml odměrné baňky a promyje se třikrát 2 ml *lihu 96% R*. Filtrát a promývací tekutina ze zředí *vodou R* na 25,0 ml. Tento roztok se použije při přípravě roztoku A.
Roztok (b). Stejným způsobem se připraví roztok bez zkoušené látky. Tento roztok se použije při přípravě roztoku B.

Do čtyř 25ml odměrných baněk se převede odděleně 10 ml roztoku (a), 10 ml roztoku (b), 10 ml základního *roztoku chloridů (8 μg Cl/ml)* (použije se na přípravu roztoku C) a 10 ml *vody R*. Do každé baňky se přidá 5 ml *síranu amonno-železitého RS5*, promíchá se a po kapkách za krouživého otáčení baňkami se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 5 ml *thiokyanatanu rtuťnatého RS*. Po protřepání se obsah každé baňky zředí *vodou R* na 25,0 ml a roztoky se nechají 15 min ve vodní lázni při 20 °C. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku A při 460 nm proti roztoku B jako kontrolní tekutině a absorbance roztoku C proti roztoku obsahujícímu 10 ml *vody R* jako kontrolní tekutině. Absorbance roztoku A není větší než absorbance roztoku C (300 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)* a 5 ml *lihu 96% R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 20 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *červeně fenolové RS* jako indikátoru do změny žlutého zbarvení na fialově červené.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,21 mg $C_7H_6O_2$.

Acidum boricum

Kyselina boritá

H_3BO_3 M_r 61,83 CAS 10043-35-3

Je to kyselina trihydrogenboritá. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny H_3BO_3.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, bezbarvé lesklé na omak mastné plátky nebo bílé krystalky. Je dobře rozpustná ve vodě a v lihu 96%, snadno rozpustná ve vroucí vodě a v glycerolu 85%.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí za mírného zahřátí v 5 ml *methanolu R*, přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové R* a roztok se zapálí. Plamen má zelený okraj.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je kyselý *(2.2.4)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 3,3 g se rozpustí v 80 ml vroucí *vody destilované R*, ochladí se a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* připravenou z *vody destilované R* na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,8 až 4,8; měří se roztok S.

Rozpustnost v lihu. 1,0 g se rozpustí v 10 ml vroucího *lihu 96% R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Organické látky. Při silném zahřívání do tmavočerveného žáru neztmavne.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí na 15 ml *vodou destilovanou R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (450 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (15 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 2,5 ml základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)* a 7,5 ml *vody R*.

Stanovení obsahu

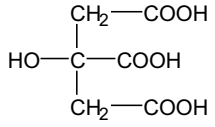
1,000 g se rozpustí zahřátím ve 100 ml *vody R* obsahující 15 g *mannitolu R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru do vzniku růžového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 61,8 mg H_3BO_3.

Acidum citricum

Kyselina citronová

Synonymum. Acidum citricum anhydricum



$C_6H_8O_7$ M_r 192,13 CAS 77-92-9

Je to kyselina 2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_8O_7$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96%, mírně rozpustná v etheru.

Taje při asi 153 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok je silně kyselý *(2.2.4)*.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny citronové CRL*. Před zkouškou se zkoušená látka i referenční látka 24 h suší při 100 °C až 105 °C.

C. Asi 5 mg se přidá ke směsi 1 ml *acetanhydridu R* a 3 ml *pyridinu R*; vznikne červené zbarvení.

D. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, neutralizuje se *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* (asi 7 ml), přidá se 10 ml *chloridu vápenatého RS* a zahřeje se k varu; vznikne bílá sraženina.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$, $HŽ_7$ nebo $ZŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Snadno zuhelnitelné látky. K 1,0 g v čisté zkumavce se přidá 10 ml *kyseliny sírové R*, ihned se umístí do vodní lázně, zahřívá se 60 min při (90 ± 1) °C a rychle se ochladí; roztok není zbarven intenzivněji než směs připravená za použití 1 ml červeného základního roztoku a 9 ml žlutého základního roztoku *(2.2.2, Metoda I)*.

Kyselina šťavelová. 0,80 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 g *zinku R* granulovaného. Směs se 1 min povaří a nechá se 2 min stát. Supernatantní tekutina se převede do zkumavky obsahující 0,25 ml roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l) a zahřeje se k varu. Rychle se ochladí, převede se do odměrného válce a přidá se stejný objem *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,25 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (50 g/l). Směs se promíchá a nechá se 30 min stát. Růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku, který se připraví současně stejným způsobem za použití 4 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (0,1 g/l), (350 μg/g, počítáno jako bezvodá kyselina šťavelová).

Sírany *(2.4.13)*. 1,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena k výrobě dialyzačních roztoků, provede se následující zkouška. 20 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,2 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 2 ml základního *roztoku hliníku (2 g Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Jako kontrolní roztok se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 5,0 g se po částech rozpustí v 39 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

0,550 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 64,03 mg $C_6H_8O_7$.

Uchovávání

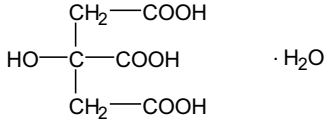
V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- prostá bakteriálních endotoxinů,
- vhodná pro výrobu dialyzačních roztoků.

Acidum citricum monohydricum

Monohydrát kyseliny citronové



$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ M_r 210,14 CAS 5949-29-1

Je to monohydrát kyseliny 2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_8O_7$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, bezbarvé krystaly nebo granule, zvětrávající. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok je silně kyselý *(2.2.4)*.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *monohydrátu kyseliny citronové CRL*. Před zkouškou se zkoušená látka i referenční látka 24 h suší při 100 °C až 105 °C.

C. Asi 5 mg se přidá ke směsi 1 ml *acetanhydridu R* a 3 ml *pyridinu R*; vzniká červené zbarvení.

D. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, neutralizuje se *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* (asi 7 ml), přidá se 10 ml *chloridu vápenatého RS* a zahřeje se k varu; vznikne bílá sraženina.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$, $HŽ_7$ nebo $ZŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Snadno zuhelnitelné látky. K 1,0 g v čisté zkumavce se přidá 10 ml *kyseliny sírové R*, ihned se umístí do vodní lázně, zahřívá se 60 min při (90 ± 1) °C a rychle se ochladí; roztok není zbarven intenzivněji než směs připravená za použití 1 ml červeného základního roztoku a 9 ml žlutého základního roztoku *(2.2.2, Metoda I)*.

Kyselina šťavelová. 0,80 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 g *zinku R* granulovaného. Směs se 1 min povaří a nechá se 2 min stát. Supernatantní tekutina se převede do zkumavky obsahující 0,25 ml roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l) a zahřeje se k varu. Rychle se ochladí, převede se do odměrného válce a přidá se stejný objem *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,25 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (50 g/l). Směs se promíchá a nechá se 30 min stát. Růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku, který se připraví současně stejným způsobem za použití 4 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (0,1 g/l), (350 μg/g, počítáno jako bezvodá kyselina šťavelová).

Sírany *(2.4.13)*. 1,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena k výrobě dialyzačních roztoků, provede se následující zkouška. 20 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,2 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití směsi 2 ml základního *roztoku hliníku (2 g Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Jako kontrolní roztok se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 5,0 g se po částech rozpustí v 39 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 7,5 % až 9,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

0,550 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 64,03 mg $C_6H_8O_7$.

Uchovávání

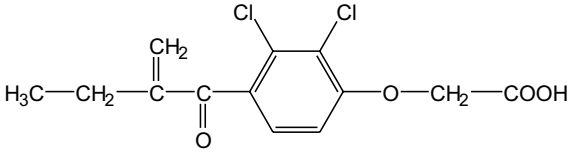
Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- prostá bakteriálních endotoxinů,
- vhodná pro výrobu dialyzačních roztoků.

† Acidum etacrynicum

Kyselina etakrynová



$C_{13}H_{12}Cl_2O_4$ M_r 303,14 CAS 58-54-8

Je to kyselina 2,3-dichlor-4-(2-methylenbutyryl)fenoxyoctová.
Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{13}H_{12}Cl_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se v amoniaku a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 121 °C až 124 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 270 nm a prodlevu při asi 285 nm. Specifická absorbance v maximu je 110 až 120.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny etakrynové CRL*.

D. 70 mg *hydroxylamoniumchloridu R* se rozpustí v 0,1 ml *vody R*, přidá se 7 ml *hydroxidu draselného v lihu RS*, zředí se *lihem 96% prostým aldehydů R* na 10 ml a nechá se stát. 1 ml supernatantní tekutiny se přidá k roztoku zkoušené látky, který se připraví rozpuštěním asi 30 mg zkoušené látky ve 2 ml *lihu 96% prostého aldehydů R*. Směs se 3 min zahřívá na vodní lázni, ochladí se, přidají se 3 ml *vody R*, 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm; směs vykazuje intenzivní modrou fluorescenci.

E. Asi 25 mg se rozpustí ve 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 0,25 ml směsi stejných objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R*, 0,5 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (100 g/l) a opatrně se přidají 2 ml *kyseliny sírové R*; vznikne intenzivní fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, ethylacetatu R* a *chloroformu R* (20 + 50 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 2,000 g se suší za tlaku 0,1 kPa až 0,5 kPa při teplotě 60 °C nad *oxidem fosforečným R*.

Síranový popel *(2.2.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

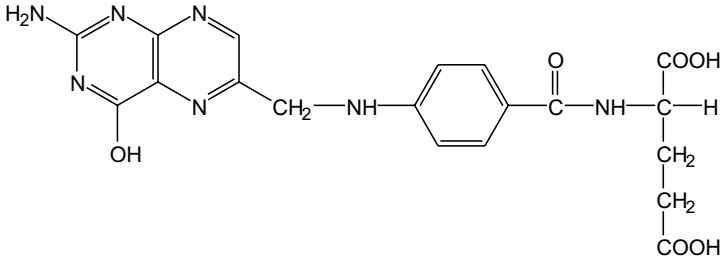
0,250 g se rozpustí ve 100 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,31 mg $C_{13}H_{12}Cl_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Acidum folicum

Kyselina listová



$C_{19}H_{19}N_7O_6$ M_r 441,40 CAS 59-30-3

Je to kyselina N[4-(2-amino-4-hydroxy-6-pteridinylmethylamino)-benzoyl]-*S*-glutamová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{19}H_{19}N_7O_6$.

Vlastnosti

Nažloutlý nebo oranžový krystalický prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě a ve většině organických rozpouštědel. Rozpouští se ve zředěných kyselinách a v alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

A. Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* je asi +20°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,25 g v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

B. 10,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 380 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima, při 256 nm, 283 nm a 365 nm. Specifické absorbance v maximech jsou asi 590, 575 a 206, počítáno na bezvodou látku. Poměr specifické absorbance v maximu při 256 nm ke specifické absorbanci v maximu při 365 nm je 2,8 až 3,0.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *kyseliny listové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *1-propanolu R* a *lihu 96% R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, fluorescencí a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Volné aminy. Hodnotí se absorbance získaná ve zkoušce Stanovení obsahu. Absorbance A_2 není větší než jedna šestina absorbance A_1.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 5,0 % až 8,5 %; stanoví se s 0,150 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v 50 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml (roztok a).

(1) Ke 3,0 ml roztoku (a) se přidá 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 50,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 g *zinku práškového R* a směs se nechá 20 min stát za občasného protřepání, chráněna před světlem. Pak se zfiltruje a prvních 10,0 ml filtrátu se odstraní. Dalších 10,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l), promíchá se a 2 min se nechá stát. Pak se přidá 5 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (5 g/l) a nechá se 2 min stát. Přidá se 5 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l), promíchá se a nechá se 10 min stát. Tento roztok se zředí *vodou R* na 50,0 ml a změří se absorbance (A_1) tohoto redukovaného roztoku v maximu při 550 nm *(2.2.25)* za použití kontrolní tekutiny, kterou je směs 25,0 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l) připravená výše popsaným způsobem.

(2) Ke 30,0 ml roztoku (a) se přidá 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 25,0 ml, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l) a dále se postupuje stejně, jak je uvedeno výše v odstavci (1). Změří se absorbance (A_2) tohoto neredukovaného roztoku.

Výše uvedený postup se opakuje s *kyselinou listovou CRL* a změří se absorbance redukovaného roztoku (A_3) a neredukovaného roztoku (A_4).

Vypočítá se obsah $C_{19}H_{19}N_7O_6$ podle vzorce:

$$\frac{A_1 - 0{,}1\ A_2}{A_3 - 0{,}1\ A_4} \cdot C,$$

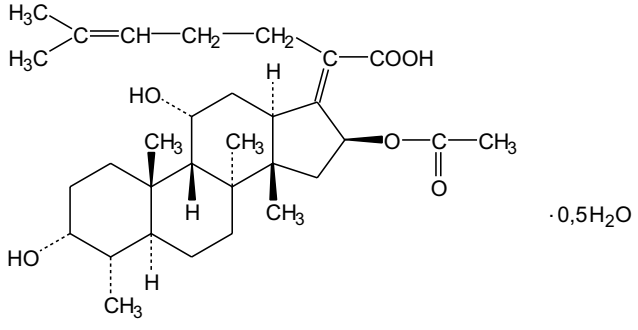
v němž značí:
C - deklarovaný obsah $C_{19}H_{19}N_7O_6$ v *kyselině listové CRL*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

† Acidum fusidicum

Kyselina fusidová



$C_{31}H_{48}O_6 \cdot 0{,}5H_2O$ M_r 525,72 CAS 6990-06-3
M_r bezvodé 516,72

Je to hemihydrát kyseliny (*Z*)-16β-acetoxy-3α,11α-dihydroxy-4α,8α,14β-trimethyl-18-nor-5α,9β, 13α-cholesta-17(20),24-dien-21-ové, protimikrobní látka produkovaná určitými kmeny *Fusidium coccineum* nebo získaná jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{31}H_{48}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě a snadno rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kyseliny fusidové*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 24 mg *diethanolamoniumfusidatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny octové ledové R*, *cyklohexanu R* a *chloroformu R* (2,5 + 10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu horkého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *kyseliny 3-ketofusidové CRL* se rozpustí v 5 ml mobilní fáze. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,20 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 µl zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,125 m až 0,15 m dlouhé a vnitřního průměru 4 mm až 5 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *methanolu R*, roztoku *kyseliny fosforečné R* (10 g/l), *vody R* a *acetonitrilu R* (10 + 20 + 20 + 50) s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 3,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, není větší než 2násobek plochy píku odpovídajícího kyselině fusidové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky kyseliny 3-ketofusidové a kyseliny fusidové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 2,5. Poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) k šumu je nejméně 3.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 1,4 % až 2,0 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení.

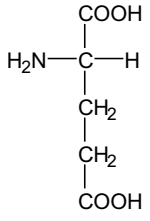
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 51,67 mg $C_{31}H_{48}O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.
Separandum.

Acidum glutamicum

Kyselina glutamová



$C_5H_9NO_4$ M_r 147,13 CAS 56-86-0

Je to kyselina (*S*)-2-aminopentan-1,5-diová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_5H_9NO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustná ve vroucí vodě, těžce rozpustná ve studené vodě, prakticky nerozpustná v kyselině octové, v acetonu, v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny glutamové CRL*. Jestliže jsou spektra rozdílná, rozpustí se zkoušená látka a referenční látka odděleně v malém množství *vody R*, odpaří se do sucha při 60 °C a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Ke 2,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 3,0 ml až 3,5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* do změny zbarvení indikátoru na červené. Přidá se směs 3 ml *formaldehydu R*, 3 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Potom se přidává *hydroxid sodný 1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení. Roztok se odbarví a dále se přidává *hydroxid sodný 1 mol/l VS* do vzniku červeného zbarvení. Celková spotřeba *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* je 4,0 ml až 4,7 ml.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,00 g se rozpustí mírným zahřátím v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +30,5° až +32,5°, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s roztokem S.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v 5 ml *amoniaku zředěného RS2* a zředí se *vodou R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *kyseliny glutamové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *kyseliny glutamové CRL* a 10 mg *kyseliny asparagové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na tenkou vrstvu se nanese odděleně 5 μl každého roztoku. Vrstva se suší v proudu vzduchu 15 min a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí v *kyselině dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g) bez dalšího přidání kyseliny dusičné.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm položených okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní hodinové sklíčko a suspenduje se v 0,5 ml *vody R*. K suspenzi se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s lakmusovým papírem se přiklopí na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zabarven než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. V dělicí nálevce se rozpustí 1,0 g v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,130 g se rozpustí mírným zahřátím v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *modři bromthymolové RS1* jako indikátoru do změny žlutého zbarvení na modré.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,71 mg $C_5H_9NO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Acidum hydrochloricum 35%

Kyselina chlorovodíková 35%

Synonymum. Acidum hydrochloricum concentratum

HCl M_r 36,46 CAS 7647-01-0

Obsahuje 35,0 % až 39,0 % sloučeniny HCl.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá dýmající kapalina s pronikavým pachem, mísitelná s vodou.
Relativní hustota je asi 1,18.

Zkoušky totožnosti

A. Po zředění *vodou R* je roztok silně kyselý *(2.2.4)*.

B. Vyhovuje zkoušce na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2 ml se smíchají s 8 ml *vody R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Volný chlor. K 15 ml se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 1 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a 0,5 ml *škrobu prostého jodidu RS* a nechá se 2 min stát na tmavém místě. Případně vzniklé modré zbarvení zmizí po přidání 0,2 ml *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* (4 μg/ml).

Sírany *(2.4.13)*. K 6,4 ml se přidá 10 mg *hydrogenuhličitanu sodného R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 15 ml *vody destilované R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (20 μg/ml).

Arsen *(2.4.2)*. 4,2 ml se zředí *vodou R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/ml).

Těžké kovy *(2.4.8)*. Zbytek získaný ve zkoušce Zbytek po odpaření se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. 5 ml roztoku se dále zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2 μg/ml). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Zbytek po odpaření. 100 g se odpaří do sucha a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 10 mg (0,01 %).

Stanovení obsahu

Baňka se zabroušenou zátkou obsahující 30 ml *vody R* se přesně zváží. Přidá se 1,5 ml zkoušené látky a znovu se zváží. Titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *červeně methylové RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 36,46 mg HCl.

Uchovávání

V dobře uzavřených lahvích ze skla nebo jiného inertního materiálu, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Separandum.

Acidum hydrochloricum 10%

Kyselina chlorovodíková 10%

Synonymum. Acidum hydrochloricum dilutum

Obsahuje 9,5 % až 10,5 % sloučeniny HCl (M_r 36,46).

Příprava

Ke 274 g *kyseliny chlorovodíkové 35%* se přidá 726 g *vody R* a promíchá se.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok je silně kyselý *(2.2.4)*.

B. Vyhovuje zkoušce na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Volný chlor. K 60 ml se přidá 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 1 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a 0,5 ml *škrobu prostého jodidu RS* a nechá se 2 min stát na tmavém místě. Případně vzniklé modré zbarvení zmizí po přidání 0,2 ml *thiosíranu sodného 0,01 mol/l VS* (1 μg/ml).

Sírany *(2.4.13)*. K 26 ml se přidá 10 mg *hydrogenuhličitanu sodného R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 15 ml *vody destilované R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (5 μg/ml).

Arsen *(2.4.2)*. 17 ml se zředí *vodou R* na 20 ml. 2 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (0,5 μg/ml).

Těžké kovy *(2.4.8)*. Zbytek získaný ve zkoušce Zbytek po odpaření se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. 5 ml roztoku se dále zředí *vodou R* na

20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (2 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Zbytek po odpaření. 100 g se odpaří do sucha a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 10 mg (0,01 %).

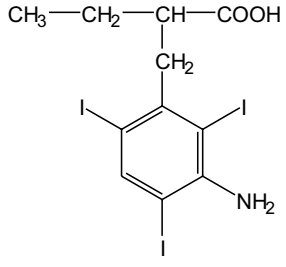
Stanovení obsahu

K 6,00 g se přidá 30 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *červeně methylové RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 36,46 mg HCl.

† Acidum iopanoicum

Kyselina jopanoová



$C_{11}H_{12}I_3NO_2$ M_r 570,93 CAS 96-83-3

Je to kyselina 2-(3-amino-2,4,6-trijodbenzyl)máselná. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{12}I_3NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, v etheru a v methanolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. Asi 155 °C, za rozkladu.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny jopanoové CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Vrstva se postříká roztokem *dimethylaminocinnamaldehydu R* (1 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *lihu 96% R* (1 + 99). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného

roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 50 mg se opatrně zahřívá v porcelánové misce nad plamenem; vyvíjejí se fialové páry.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_3$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* zapoužití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (3 + 97) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (3 + 97) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *kyseliny jopanoové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (3 + 97) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
*Porovnávací roztok (b).*1ml zkoušeného roztoku(b)se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (3 + 97) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *toluenu R* a *dioxanu R* (10 + 20 + 20 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Halogenidy. K 0,46 g se přidá 10 ml *kyseliny dusičné R* a 15 ml *vody R*, třepe se 5 min a pak se zfiltruje. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy *(2.4.4)* (180 µg/g, vyjádřeno jako chloridy).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Do 250 ml varné baňky se k 0,150 g přidá 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 20 ml *vody R*, 1 g *zinku práškového R* a několik varných kuliček. Vaří se 60 min pod zpětným chladičem, pak se ochladí a chladič se promyje 20 ml *vody R*, která se přidá do varné baňky. Obsah baňky se zfiltruje a filtr se promyje několikrát *vodou R*. K spojenému filtrátu se přidá 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a ihned se titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití vhodného systému elektrod, např. stříbrné-merkurosulfatové.

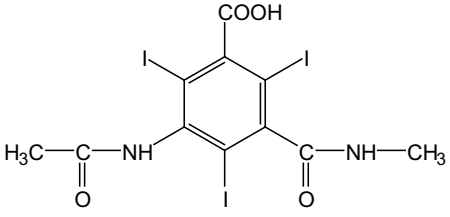
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,03 mg $C_{11}H_{12}I_3NO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

† Acidum iotalamicum

Kyselina jotalamová



$C_{11}H_9I_3N_2O_4$ M_r 613,92 CAS 2276-90-6

Je to kyselina 3-acetylamino-2,4,6-trijod-5-(methylaminokarbonyl)benzoová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_9I_3N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustná ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny jotalamové CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 3 % (*V/V*) *amoniaku 17,5% RS* a zředí se stejným rozpouštědlem na 5 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *kyseliny jotalamové CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 3 % *(V/V) amoniaku 17,5% RS* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *2-butanonu R* a *toluenu R* (20 + 25 + 60) po dráze 15 cm. Potom se vrstva vysuší do vytěkání rozpouštědel a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 50 mg se opatrně zahřívá v porcelánové misce nad plamenem; vyvíjejí se fialové páry.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu - GF$_{254}$ R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 3 % *(V/V) amoniaku 17,5% RS* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 50 ml. 1 ml takto připraveného roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 mg *5-amino-2,4,6-trijod-N-methylisoftalamové kyseliny CRL* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R, methanolu R, etheru R* a *dichlormethanu R* (1 + 1 + 1 + 5 + 10) po dráze 10 cm. Potom se vrstva vysuší do vytěkání rozpouštědel a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Halogenidy. 0,55 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 15 ml *vody R*, přidá se 6 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy *(2.4.4)* (150 μg/g, vyjádřeno jako chloridy).

Volné aromatické aminy. *Roztoky a zkoumadla se udržují v ledové vodě a chrání se před přímým světlem*. K 0,50 g v 50ml odměrné baňce se přidá 15 ml *vody R*, protřepe se, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a ochladí se v ledové vodě. K ochlazené směsi se přidá 5 ml čerstvě připraveného roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l) a 12 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Opatrně se protřepe a nechá se stát přesně 2 min od přidání kyseliny chlorovodíkové. Potom se přidá 10 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l), nechá se 5 min stát za občasného protřepání, přidá se 0,15 ml roztoku *1-naftolu R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, protřepe se a nechá se stát dalších 5 min. Potom se přidá 3,5 ml *tlumivého roztoku o pH 10,9*, promíchá se a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 485 nm do 20 min po přípravě proti kontrolnímu roztoku připravenému současně stejným způsobem bez zkoušené látky (slepá zkouška). Absorbance není vyšší než 0,30.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml takto připraveného roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,300 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Do 250ml varné baňky se odváží 0,150 g, přidá se 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 20 ml *vody R*, 1 g *zinku práškového R* a několik varných kuliček. Vaří se 30 min pod zpětným chladičem, ochladí se a chladič se promyje 20 ml *vody R*, která se přidá do varné baňky. Obsah baňky se zfiltruje, filtr se promyje několikrát *vodou R*. Ke spojenému filtrátu se přidá 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a ihned se titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití vhodného systému elektrod, např. stříbrné-merkurosulfatové.

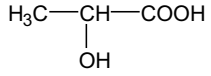
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,47 mg $C_{11}H_9I_3N_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

Acidum lacticum

Kyselina mléčná



$C_3H_6O_3$ M_r 90,08 CAS 50-21-5

Je to směs kyseliny 2-hydroxypropionové, jejích kondenzačních produktů (kyseliny laktylmléčné a kyseliny polymléčné) a vody. Rovnováha mezi kyselinou 2-hydroxypropionovou a jejími kondenzačními produkty je závislá na koncentraci a teplotě.

Kyselina mléčná je obvykle racemát (kyselina (*RS*)-2-hydroxypropionová), ale může převládat (*S*)-izomer. Obsahuje 88,0 % až 92,0 % sloučeniny $C_3H_6O_3$.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo nažloutlá sirupovitá kapalina. Je mísitelná s vodou, s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok je silně kyselý *(2.2.4)*.

B. Relativní hustota *(2.2.5)*: 1,20 až 1,21.

C. Vyhovuje zkoušce na mléčnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve 42 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Vzhled. Roztok S není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Látky nerozpustné v etheru. 1,0 g se rozpustí ve 25 ml *etheru R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než *ether R* použitý ke zkoušce.

Cukry a jiné redukující látky. K 1 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se přidá 1,5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS,* 2 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se k varu; nevznikne červená nebo nazelenalá sraženina.

Těkavé mastné kyseliny. 5 g se opatrně zahřívá 10 min ve 100ml baňce se zabroušenou zátkou při 50 °C. Ihned po otevření baňky není cítit nepříjemný pach připomínající nižší mastné kyseliny.

Methanol a methylestery. 2,0 g se přenesou do baňky s kulatým dnem a zabroušenou zátkou a přidá se 10 ml *vody R*. Baňka se ochladí v ledové vodě, opatrně se přidá 30 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (300 g/l) a nechá se stát 10 min až 15 min ve stejné chladicí lázni. Potom se nasadí chladič a destiluje se s vodní parou. Destilát se jímá do 10ml odměrné baňky obsahující 1 ml *ethanolu R*. Destiluje se, až se získá asi 9,5 ml destilátu, který se zředí *vodou R* na 10,0 ml. 1,0 ml takto získaného destilátu se přenese do zkumavky, přidá se 5 ml *manganistanu draselného v kyselině fosforečné RS* a promíchá se. Po 15 min se přidají 2 ml *kyseliny šťavelové v kyselině sírové RS* a skleněnou tyčinkou se míchá do odbarvení. Potom se přidá 5 ml *fuchsinu RS* a nechá se 2 h stát. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem

jako zkoušený roztok s tím rozdílem, že se místo destilátu použije 1,0 ml roztoku obsahujícího 100 μg *methanolu R* a 0,1 ml *ethanolu R* (500 μg/g, vyjádřeno jako methanol).

Kyselina citronová, šťavelová a fosforečná. K 5 ml roztoku S se přidá *amoniak zředěný RS1* do slabě zásadité reakce *(2.2.4)* a přidá se 1 ml *chloridu vápenatého RS*. Roztok se zahřívá 5 min na vodní lázni. Tento roztok neopalizuje před zahříváním ani po zahřívání intenzivněji než porovnávací roztok připravený za použití 1 ml *vody R* a 5 ml roztoku S.

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě infuzních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, provede se následující zkouška na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje nitrožilně na 1 kg hmotnosti králíka 10 ml takto připraveného roztoku: k množství zkoušené látky odpovídajícímu asi 3,46 g $C_3H_6O_3$ se přidá 38,4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* připraveného z *vody na injekci R* a zředí se *vodou na injekci R* na 100 ml. Směs se 5 min vaří a po ochlazení se zředí stejným rozpouštědlem na 250 ml.

Stanovení obsahu

K 1,000 g se v baňce se zabroušenou zátkou přidá 10 ml *vody R* a 20,0 ml roztoku *hydroxidu sodného 1 mol/l VS*. Baňka se uzavře a nechá se 30 min stát. Potom se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* do odbarvení růžového zbarvení.

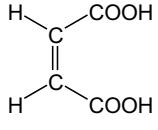
1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 90,08 mg $C_3H_6O_3$.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka prostá pyrogenních látek.

Acidum maleicum

Kyselina maleinová



$C_4H_4O_4$ M_r 116,07 CAS 110-16-7

Je to kyselina *(Z)*-butendiová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_4O_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%, mírně rozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 10 ml; hodnota pH tohoto roztoku je menší než 2.

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Kyselina fumarová, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* (roztok a). K 0,3 ml roztoku (a) se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; roztok zůstává bezbarvý. Ke 3 ml roztoku (a) se přidá 1 ml *bromové vody RS* a zahřívá se na vodní lázni do odstranění bromu (15 min), potom se zahřeje k varu a ochladí. K 0,2 ml tohoto roztoku se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni. Vzniká fialově růžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kyselina fumarová. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,5 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *kyseliny maleinové CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 15 mg *kyseliny fumarové CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 5 ml porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl zkoušených roztoků (a) a (b), po 5 μl porovnávacích roztoků (a) a (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (c) a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, chloroformu R, 1-butanolu R* a *heptanu R* (12 + 16 + 32 + 44) po dráze 10 cm. Vrstva se 15 min suší při 100 °C a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající kyselině fumarové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,05 ml *bromové vody RS*. Po 5 min se odstraní přebytek bromu proudem vzduchu, přidají se 3 ml *thiokyanatanu draselného RS* a protřepe se. Porovnávací roztok se připraví současně stejným způsobem za použití směsi 5 ml základního *roztoku železa (1 μg Fe/ml)*, 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 6 ml

vody R a 0,05 ml *bromové vody RS* a oba roztoky se nechají 5 min stát. Červené zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (5 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 58,04 mg $C_4H_4O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených skleněných obalech, chráněna před světlem.

Acidum methacrylicum et ethylis acrylas polymerisatum 1 : 1

Kopolymer kyseliny methakrylové a ethylakrylatu 1 : 1

Je to kopolymer kyseliny methakrylové a ethylakrylatu se střední relativní molekulovou hmotností asi 250 000. Poměr karboxylových skupin k esterovým skupinám je asi 1 : 1. Může obsahovat vhodné povrchově aktivní látky, jako dodecylsíran sodný a polysorbát 80. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 46,0,% až 50,6 % jednotek kyseliny methakrylové.

Vlastnosti

Bílý sypký prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a v 2-propanolu a prakticky nerozpustný v ethylacetatu. Je snadno rozpustný v roztoku hydroxidu sodného (40 g/l).

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kopolymeru kyseliny methakrylové a ethylakrylatu 1 : 1*.

B. Zkouška Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Zjevná viskozita. 100 mPa.s až 200 mPa.s. Rozpustí se množství zkoušené látky odpovídající 37,5 g vysušené látky ve směsi 7,9 g *vody R* a 254,6 g *2-propanolu R* a stanoví se viskozita (*2.2.10*) na rotačním viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Vzhled filmu. 1 ml roztoku připraveného pro zkoušku Viskozita se nalije na skleněnou destičku a vysuší se. Vznikne průsvitný křehký film.

Ethylakrylat a kyselina methakrylová. Celkový obsah nejvýše 0,1 %. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v 50,0 ml *methanolu R* a přidá se 25,0 ml *vody R*.
Kontrolní roztok. K 50,0 ml *methanolu R* se přidá 25,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. 10 mg *ethylakrylatu R* a 10 mg *kyseliny methakrylové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí na 50,0 ml *methanolem R* a potom se přidá 25,0 ml *vody R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 2,0* (30 + 70), s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 202 nm,

Nastříkne se odděleně po 50 µl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píky ethylakrylatu a kyseliny methakrylové nejméně 2,0. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogram kontrolního roztoku nevykazuje žádné píky s retenčními časy odpovídajícími píkům ethylakrylatu a kyseliny methakrylové. Obsah monomerů v procentech se vypočítá z plochy píků na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku a z obsahu monomerů v porovnávacím roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 6 h v sušárně při 100 C až 105 C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,4 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí ve 100 ml *acetonu R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Stanovení lze provést i tehdy, pokud roztok není čirý.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 86,09 mg $C_4H_6O_2$ (jednotky kyseliny methakrylové).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě nepřevyšující 30 C.

Označování

V označení na obalu se uvede název a koncentrace povrchově aktivních látek, pokud byly přidány.

Acidum methacrylicum et ethylis acrylas polymerisatum 1 : 1 dispersio 30%

Disperze kopolymeru kyseliny methakrylové a ethylakrylatu 1 : 1 30%

Je to disperze kopolymeru kyseliny methakrylové a ethylakrylatu se střední molekulovou hmotností asi 250 000 ve vodě. Poměr karboxylových skupin k esterovým skupinám je asi 1 : 1. Může obsahovat vhodné povrchově aktivní látky, jako je dodecylsíran sodný a polysorbát 80. Vztaženo na zbytek po odpaření, obsahuje 46,0 % až 50,6 % jednotek kyseliny methakrylové.

Vlastnosti

Bílá opalizující velmi viskózní tekutina. Je mísitelná s vodou a s roztokem hydroxidu sodného (40 g/l). Přidáním rozpouštědel, jako je aceton, ethanol nebo 2-propanol, vzniká sraženina, rozpustná v nadbytku rozpouštědla.

Snadno dochází k mikrobiálnímu znečištění.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. 30% disperze kopolymeru kyseliny methakrylové a ethylakrylatu 1 : 1.*

B. Zkouška Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Zjevná viskozita. Nejvýše 15 mPa.s; stanoví se viskozita (*2.2.10*) na rotačním viskozimetru při 20 °C a při smykové rychlosti 50 s^{-1}.

Vzhled filmu. 1 ml se nalije na skleněnou destičku a vysuší se. Vznikne průsvitný křehký film.

Velikost částic. 100,0 g se zfiltruje přes předem zvážené síto (90) z nerezové oceli, síto se promývá *vodou R,* až je filtrát čirý, a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1,00 g.

Ethylakrylat a kyselina methakrylová. Celkový obsah nejvýše 0,1 %, počítáno na vysušenou látku. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v 50,0 ml *methanolu R* a přidá se 25,0 ml *vody R.*
Kontrolní roztok. K 50,0 ml *methanolu R* se přidá 25,0 ml *vody R.*
Porovnávací roztok. 10 mg *ethylakrylatu R* a 10 mg *kyseliny methakrylové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml a potom se přidá 25,0 ml *vody R.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 2,0* (30 + 70), s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 202 nm.

Nastříkne se odděleně po 50 µl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píky ethylakrylatu a kyseliny methakrylové nejmé-

ně 2,0. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogram kontrolního roztoku nevykazuje žádné píky s retenčními časy odpovídajícími píkům ethylakrylatu a kyseliny methakrylové. Obsah monomerů v procentech se vypočítá z plochy píků na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku a z obsahu monomerů v porovnávacím roztoku.

Zbytek po odpaření. 0,285 g až 0,315 g; 1,000 g se suší 5 h při 110 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 živých aerobních mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou.

Stanovení obsahu

3,000 g se rozpustí ve 100 ml *acetonu R* a pomalu se titruje za intenzivního míchání *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 86,09 mg $C_4H_6O_2$ (jednotky kyseliny methakrylové).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě 2 °C až 25 °C, chráněna před mrazem. S látkou je třeba zacházet tak, aby se minimalizovalo mikrobiální znečištění.

Označování

V označení na obalu se uvede název a koncentrace povrchově aktivních látek, pokud byly přidány.

Acidum methacrylicum et methylis methacrylas polymerisatum 1 : 1

Kopolymer kyseliny methakrylové a methylmethakrylatu 1 : 1

Je to kopolymer kyseliny methakrylové a methylmethakrylatu o průměrné relativní molekulové hmotnosti asi 135 000. Poměr karboxylových a esterových skupin je asi 1 : 1. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 46,0 % až 50,6 % jednotek kyseliny methakrylové.

Vlastnosti

Bílý sypký prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a 2-propanolu a prakticky nerozpustný v ethylacetatu. Je snadno rozpustný v roztoku hydroxidu sodného (40 g/l).

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kopolymeru kyseliny methakrylové a methylmethakrylatu 1 : 1.*

B. Zkouška Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Zjevná viskozita. 50 mPa.s až 200 mPa.s. Množství zkoušené látky odpovídající 37,5 g vysušené látky se rozpustí ve směsi 7,9 g *vody R* a 254,6 g *2-propanolu R* a stanoví se viskozita (*2.2.10*) za použití rotačního viskozimetru při 20 °C a při smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Vzhled filmu. 1 ml roztoku připraveného pro zkoušku Zjevná viskozita se nalije na skleněnou destičku a vysuší se. Vznikne průsvitný křehký film.

Methylmethakrylat a kyselina methakrylová. Celkový obsah nejvýše 0,1 %. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v 50,0 ml *methanolu R* a přidá se 25,0 ml *vody R*.
Kontrolní roztok. K 50,0 ml *methanolu R* se přidá 25,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. 10 mg *methylmethakrylatu R* a 10 mg *kyseliny methakrylové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml a přidá se 25,0 ml *vody R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 2,0* (30 + 70), s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 202 nm.

Nastříkne se odděleně po 50 µl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píky methylmethakrylatu a kyseliny methakrylové nejméně 2,0. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogram kontrolního roztoku nevykazuje žádné píky s retenčními časy odpovídajícími píkům methylmethakrylatu a kyseliny methakrylové. Vypočítá se obsah monomerů v procentech z plochy píků na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku a obsahu monomerů v porovnávacím roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 6 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí ve 100 ml *methanolu R* a pomalu se titruje za silného míchání *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Stanovení lze provést i tehdy, pokud roztok není čirý.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 86,09 mg $C_4H_6O_2$ (jednotky kyseliny methakrylové).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Acidum methacrylicum et methylis methacrylas polymerisatum 1 : 2

Kopolymer kyseliny methakrylové a methylmethakrylatu 1 : 2

Je to kopolymer kyseliny methakrylové a methylmethakrylatu se střední relativní molekulovou hmotností asi 135 000. Poměr karboxylových skupin k esterovým skupinám je asi 1 : 2. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 27,6 % až 30,7 % jednotek kyseliny methakrylové.

Vlastnosti

Bílý sypký prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a 2-propanolu a prakticky nerozpustný v ethylacetatu. Je snadno rozpustný v roztoku hydroxidu sodného (40 g/l).

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kopolymeru kyseliny methakrylové a methylmethakrylatu 1 : 2*.

B. Zkouška Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Zjevná viskozita. 50 mPa.s až 200 mPa.s. Množství zkoušené látky odpovídající 37,5 g vysušené látky se rozpustí ve směsi 7,9 g *vody R* a 254,6 g *2-propanolu R* a stanoví se viskozita (*2.2.10*) za použití rotačního viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Vzhled filmu. 1 ml roztoku připraveného pro zkoušku Zjevná viskozita se nalije na skleněnou destičku a vysuší se. Vznikne průsvitný křehký film.

Methylmethakrylat a kyselina methakrylová. Celkový obsah nejvýše 0,1 %. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v 50,0 ml *methanolu R* a přidá se 25,0 ml *vody R*.
Kontrolní roztok. K 50,0 ml *methanolu R* se přidá 25,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. 10 mg *methylmethakrylatu R* a 10 mg *kyseliny methakrylové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml a potom se přidá 25,0 ml *vody R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 2,0* (30 + 70), s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 202 nm.

Nastříkne se odděleně po 50 µl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píky methylmethakrylatu a kyseliny methakrylové nejméně 2,0. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogram kontrolního roztoku nevykazuje žádné píky s retenčními časy odpovídajícími píkům methylmethakrylatu a kyseliny methakrylové. Obsah

monomerů v procentech se vypočítá z plochy píků na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku a z obsahu monomerů v porovnávacím roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 6 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí ve 100 ml *acetonu R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Stanovení lze provést i tehdy, pokud roztok není čirý.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 86,09 mg $C_4H_6O_2$ (jednotky kyseliny methakrylové).

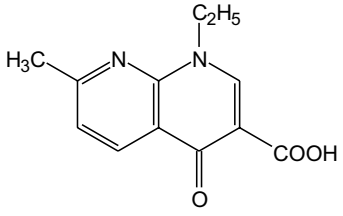
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

---

† Acidum nalidixicum

Kyselina nalidixová



$C_{12}H_{12}N_2O_3$ M_r 232,24 CAS 389-08-2

Je to kyselina 1-ethyl-7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naftyridin-3-karboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

Vlastnosti

Téměř bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v dichlormethanu, těžce rozpustná v acetonu a v lihu 96% a velmi těžce rozpustná v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 230 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 12,5 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při

230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 258 nm a 334 nm. Poměr absorbance naměřené při 258 nm k absorbanci naměřené při 334 nm je 2,2 až 2,4.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny nalidixové CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a přidá se 0,5 ml roztoku *2-naftolu R* (100 g/l) v *lihu 96% R*; vzniká oranžovočervené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Absorbance. 1,50 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* měřená při 420 nm je nejvýše 0,10.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu* HF_{254} *R*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *kyseliny nalidixové CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1, dichlormethanu R a lihu 96% R* (10 + 20 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,04 %).

Těžké kovy *(2.4.8).* 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*, přidá se 30 ml *2-propanolu R* a 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.* Titrovaný roztok se v titrační nádobě vhodně uzavřené probublává *dusíkem R* a jeho teplota se udržuje na 15 °C až 20 °C. Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za použití argentochloridové porovnávací elektrody s membránou nebo kapilární špičkou, naplněné nasyceným roztokem *chloridu lithného R* v *ethanolu R* a skleněné elektrody jako indikační.

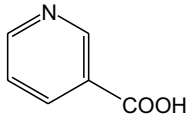
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,22 mg $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

Acidum nicotinicum

Kyselina nikotinová



$C_6H_5NO_2$ M_r 123,11 CAS 59-67-6

Je to kyselina pyridin-3-karboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_6H_5NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustná ve vroucí vodě a vroucím lihu 96%, mírně rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná a prakticky nerozpustná v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 234 °C až 240 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny nikotinové CRL*.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml *bromkyanu RS* a 3 ml roztoku *anilinu R* (25 g/l) a roztok se protřepe; vzniká žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *1-propanolu R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se 10 min suší při 100 °C až 105 °C a potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 0,25 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení. Provede se slepá zkouška.

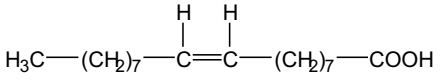
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,31 mg $C_6H_5NO_2$.

Uchovávání

Chráněna před světlem.

Acidum oleicum

Kyselina olejová



$C_{18}H_{34}O_2$ M_r 282,47 CAS 112-80-1

Je to kyselina (*Z*)-9-oktadecenová. Obsahuje nejméně 60,0 % sloučeniny $C_{18}H_{34}O_2$ spolu s proměnným množstvím nasycených a nenasycených mastných kyselin. Může obsahovat vhodnou antioxidační látku.

Vlastnosti

Čirá nažloutlá nebo nahnědlá olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%, s etherem a s dichlormethanem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá methylesteru kyseliny olejové.

C. K 1 ml se přidá 1 ml *lihu 96% R*; směs je čirá. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS*; roztok je oranžový nebo červený.

D. Do zkumavky o vnitřním průměru asi 12 mm se převede 1 ml *kyseliny dusičné R* a 1 ml *vody R*. Na povrch směsi se navrství 1 ml zkoušené látky a do zkumavky se vloží 0,5 g *mědi R* (drát nebo špona ne delší než 10 mm) tak, aby zasahovala do spodní vrstvy. Zkumavka se uzavře a nechá se 4 h stát; vrchní vrstva ztuhne.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Zkoušená látka není intenzivněji zbarvena než porovnávací barevný roztok $Ž_1$ nebo $HŽ_1$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,889 až 0,895.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. 195 až 202; stanoví se s 0,5 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 87 až 97.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 10,0.

Tuky a uhlovodíky. 1 ml zkoušené látky se vaří s 5 ml *uhličitanu sodného RS* a 25 ml *vody R*. Vodná vrstva ještě horká neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Kyseliny rozpustné ve vodě. 5 ml zkoušené látky se 2 min protřepává s 5 ml *vody R*. Vodná vrstva se zfiltruje přes navhlčený filtrační papír a k filtrátu se přidá 0,05 ml *oranže methylové RS*; tekutina nezčervená.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se zkouška na Cizí oleje v olejích plynovou chromatografií *(2.4.22)* za použití zkoušeného roztoku připraveného takto:

Zkoušený roztok. 4,0 g se naváží do 100ml varné baňky se zábrusem opatřené zpětným chladičem a postranním vstupem na zavádění plynu. Přidá se 40 ml *methanolu bezvodého R* a 0,5 ml *kyseliny sírové R*. Připojí se zpětný chladič a zavádí se *dusík R* rychlostí asi 100 ml/min. Protřepává se a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem. Ochladí se pod tekoucí vodou a obsah baňky se přenese do dělicí nálevky. Baňka se promyje 20 ml *heptanu R*, který se přidá do dělicí nálevky. Přidá se asi 40 ml *vody R* a mírně se protřepává. Vznikne-li emulze, přidává se po kapkách *heptan R*. Vrstvy se nechají oddělit, vodná fáze se oddělí a vytřepe znova 20 ml *heptanu R* a nechá se stát. Organické fáze se spojí, promyjí se dvakrát 20 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, přefiltrují se přes vatu do 50ml kuželové baňky a odpaří se v proudu *dusíku R* na vodní lázni na vhodný objem.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní pík odpovídá methylesteru kyseliny olejové. Vypočítá se procentuální obsah kyseliny olejové metodou vnitřní normalizace.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede název a koncentrace přidané antioxidační látky.

Acidum peraceticum 35%

N

Kyselina peroctová 35%

$C_2H_4O_3$ M_r 76,05 CAS 79-21-0

Je to roztok kyseliny peroctové obsahující výchozí složky kyselinu octovou ($C_2H_4O_2$; M_r 60,05) a peroxid vodíku (H_2O_2; M_r 34,01) vedle malého množství kyseliny sírové (H_2SO_4; M_r 98,07) a

vhodného stabilizátoru. Obsahuje 32,0 % až 36,0 % kyseliny peroctové a 5,0 % až 12,0 % peroxidu vodíku.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá až slabě nažloutlá tekutina, pachu pichlavě kyselého, leptavých vlastností. Její páry jsou hořlavé. Působením iontů těžkých kovů a oxidovatelných organických látek se rozkládá již při obyčejné teplotě za vývoje kyslíku.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 1,0 g se zředí *vodou R* na 100 ml. Roztok se použije také ke zkoušce B. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a za stálého protřepávání po kapkách *manganistan draselný 0,02 mol/l RS*. Při tom se vyvíjí kyslík a přidávaný roztok se odbarvuje (peroxid). V přidávání roztoku se pokračuje do slabě červeného zbarvení, které přechází rychle v hnědočervený zákal, a roztok se postupně barví červenofialově (kyselina peroctová).

B. K 5 ml roztoku ze zkoušky A se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 2 ml *etheru R* a 0,05 ml *dichromanu draselného RS*, protřepáním se etherová vrstva zbarví modře (peroxid).

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Tekutina je čirá *(2.2.1)* a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_9 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kyselina sírová. Asi 1,000 g se zředí 50 ml *vody R* a zahřeje se k varu. Potom se přidá 16 ml horkého *chloridu barnatého RS* a 1 h se zahřívá za promíchávání na vodní lázni. Vzniklá sraženina se zachytí kvantitativním filtrem nebo ve filtračním kelímku, promývá se horkou *vodou R* do vymizení chloridových iontů, vyžíhá do konstantní hmotnosti a po vychladnutí se zváží. 1 g zbytku odpovídá 0,4198 g H_2SO_4. Obsah kyseliny sírové je nejvýše 1,0 %.

Stanovení obsahu

Peroxid vodíku. Do 50ml odměrné baňky, která obsahuje 25 ml *vody R*, ochlazené na 1 °C až 5 °C se přidá asi 1,000 g zkoušené tekutiny a doplní se *vodou R* téže teploty po značku. Potom se ihned k 5 ml tohoto roztoku ve 100ml kuželové baňce se zábrusem přidá 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové zředěné RS* a *vody R* (1 + 1), ochlazené na 0 °C až 5 °C, a titruje se *manganistanem draselným 0,02 mol/l VS* do slabě růžového zbarvení. Ztitrovaný roztok se ihned použije ke stanovení kyseliny peroctové.

1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* odpovídá 1,701 mg H_2O_2.

Kyselina peroctová. Ke ztitrovanému roztoku ze zkoušky Peroxid vodíku se ihned přidají 2 ml *jodidu draselného RS* a 0,05 ml *molybdenanu hexaamonného RS*, baňka se uzavře a směs se promíchá. Po 5 min se vyloučený jod titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* do slabě žlutého zbarvení. Potom se přidá 1 ml *škrobu RS* a dotitruje se do odbarvení.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,802 mg $C_2H_4O_3$.

Uchovávání

V chladu, v nádobách z plastických hmot naplněných nejvýše do 90 % obsahu a opatřených uzávěrem s úpravou pro uvolnění přetlaku. Je to žíravina a hořlavina III. třídy nebezpečnosti, páry jsou výbušné. Pro její skladování a manipulaci platí předpisy ČSN 65 0201.

Vydávání

Vydávají se roztoky vhodně ředěné, které se uchovávají za snížené teploty a musí být spotřebovány nejpozději do 7 dnů po jejich přípravě. Požadovaná koncentrace se vztahuje na obsah kyseliny peroctové.

† Acidum phosphoricum 85%

Kyselina fosforečná 85%

Synonymum. Acidum phosphoricum concentratum

H_3PO_4 M_r 98,00 CAS 7664-38-2

Obsahuje 84,0 % až 90,0 % H_3PO_4.

Vlastnosti

Sirupovitá čirá bezbarvá kapalina s korozivními účinky, mísitelná s vodou a s lihem 96%. Uchovávána při nízké teplotě tuhne za vzniku bezbarvých krystalů, které tají při teplotě nad 28 °C.

Relativní hustota je asi 1,7.

Zkoušky totožnosti

A. Po zředění *vodou R* reaguje silně kysele *(2.2.4)*.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, zneutralizovaný *hydroxidem sodným zředěným RS* vyhovuje zkoušce na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se zředí *vodou R* na 150 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Látky srážené amoniakem. K 10 ml roztoku S se přidá 8 ml *amoniaku zředěného RS1*; roztok neopalizuje intenzivněji než směs obsahující 10 ml roztoku S a 8 ml *vody R*.

Kyselina fosforná a kyselina fosforitá. K 5 ml roztoku S se přidají 2 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a roztok se 5 min zahřívá na vodní lázni; vzhled roztoku se nezmění.

Chloridy *(2.4.4)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,5 g se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 7,5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. Ke 2,5 g se přidají 4 ml *amoniaku zředěného RS1* a roztok se zředí *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 3 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Stanovení obsahu

K 1,000 g se přidá roztok připravený rozpuštěním 10 g *chloridu sodného R* ve 30 ml *vody R*. Titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 49,00 mg H_3PO_4.

Uchovávání

V dobře uzavřených skleněných nádobách.

Separandum.

Acidum phosphoricum 10%

Kyselina fosforečná 10%

Synonymum. Acidum phosphoricum dilutum

Obsahuje 9,5 % až 10,5 % H_3PO_4 (M_r 98,00).

Příprava

115 g kyseliny fosforečné 85% se smíchá s 885 g *vody R*.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok reaguje silně kysele *(2.2.4)*.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, zneutralizovaný *hydroxidem sodným zředěným RS* vyhovuje zkoušce na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 86,0 g se zředí *vodou R* na 150 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S na Zkoušky na čistotu je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Látky srážené amoniakem. K 10 ml roztoku S se přidá 8 ml *amoniaku zředěného RS1*; roztok neopalizuje intenzivněji než směs obsahující 10 ml roztoku S a 8 ml *vody R*.

Kyselina fosforná a kyselina fosforitá. K 5 ml roztoku S se přidají 2 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a roztok se 5 min zahřívá na vodní lázni; vzhled roztoku se nezmění.

Chloridy *(2.4.4)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (6 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml zkoušené látky vyhovuje limitní zkoušce na sírany (10 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 7,5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (0,2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 20 g se smíchá se 4 ml *amoniaku zředěného RS1* a roztok se zředí *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (1 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 8 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)* a 2 ml *vody R*.

Železo *(2.4.9)*. 3 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (6 μg/g).

Stanovení obsahu

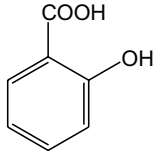
K 8,60 g se přidá roztok připravený rozpuštěním 10 g *chloridu sodného R* ve 30 ml *vody R*. Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 49,00 mg H_3PO_4.

Acidum salicylicum

1998

Kyselina salicylová



$C_7H_6O_3$ M_r 138,12 CAS 69-72-7

Je to kyselina 2-hydroxybenzoová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_7H_6O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bílé nebo bezbarvé jehlicovité krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru, mírně rozpustná v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 158 °C až 161 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny salicylové CRL*.

C. Asi 30 mg se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného 0,05 mol/l RS*, v případě potřeby se zneutralizuje a zředí se *vodou R* na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce totožnosti (a) na salicylany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí zahřátím v 50 ml *vody destilované R* a po ochlazení se zfiltruje.

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *fenolu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 25 mg *kyseliny 4-hydroxyisoftalové R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 50 mg *kyseliny 4-hydroxybenzoové R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (e). Po 1,0 ml porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (f). Po 0,1 ml porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provede za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,15 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné neaktivním *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové R*, *methanolu R* a *vody R* (1 + 40 + 60), s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 270 nm.

Nastříkne se po 10 µl porovnávacích roztoků (d) a (e). Po zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou relativní retenční časy vztažené k fenolu následující: kyseliny 4-hydroxybenzoové asi 0,70; kyseliny 4-hydroxyisoftalové asi 0,90. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) byla nejméně 70 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) druhý pík odpovídá píku fenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) a rozlišení mezi píkem odpovídajícím kyselině 4-hydroxyisoftalové a píkem odpovídajícím fenolu není menší než 1,0. Jestliže tohoto rozlišení nebylo dosaženo, upraví se množství kyseliny octové v mobilní fázi.

Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (f). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plochy píků odpovídajících kyselině 4-hydroxybenzoové, kyselině 4-hydroxyisoftalové a fenolu nejsou větší než odpovídající píky na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (0,1 % pro kyselinu 4-hydroxybenzoovou; 0,05 % pro kyselinu 4-hydroxyisoftalovou a 0,02 % pro fenol).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píků odpovídajících kyselině 4-hydroxybenzoové, kyselině 4-hydroxyisoftalové a fenolu, není větší než plocha píku odpovídajícího kyselině 4-hydroxyisoftalové na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (0,05 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy píku odpovídajícího kyselině 4-hydroxybenzoové na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (0,2 %). K píkům s plochou menší, než je 0,01násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (f), se nepřihlíží.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Sírany. Nejvýše 200 µg/g. 1,0 g se rozpustí v 5 ml *dimethylformamidu R*, přidají se 4 ml *vody destilované R* a důkladně se promíchá. Přidá se 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *chloridu barnatého R* (250 g/l). Po 15 min není opalescence roztoku intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného takto: ke 2 ml základního *roztoku síranů (100 µg SO_4 /ml)* se přidá 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 0,5 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (250 g/l), 3 ml *vody destilované R* a 5 ml *dimethylformamidu R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí v 15 ml *lihu 96% R* a přidá se 5 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 µg/g). Použije se porovnávací roztok olova (2 µg Pb/ml) připravený ze základního *roztoku olova (100 µg Pb/ml)* zředěním směsí objemových dílů *vody R* a objemových dílů *lihu 96% R* (5 + 15).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v exsikátoru.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

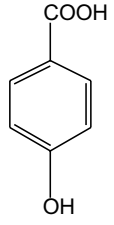
0,120 g se rozpustí ve 30 ml *lihu 96% R* a přidá se 20 ml *vody R*. Jako indikátor se použije 0,1 ml *červeně fenolové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku červenofialového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,81 mg $C_7H_6O_3$.

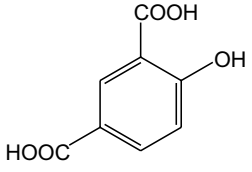
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Nečistoty



A. kyselina 4-hydroxybenzoová,

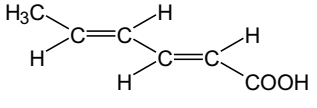


B. kyselina 4-hydroxy-1,3-benzendikarboxylová (kyselina 4-hydroxyisoftalová),

C. fenol.

Acidum sorbicum

Kyselina sorbová



$C_6H_8O_2$ M_r 112,13 CAS 110-44-1

Je to kyselina (*E,E*)-hexa-2,4-dienová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_8O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 132 °C až 136 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 250,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 200,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 264 nm. Specifická absorbance v maximu je 2150 až 2550.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny sorbové CRL*.

D. 0,2 g se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R* a přidají se 0,2 ml *bromové vody R*; roztok se odbarví.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Aldehydy. 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *2-propanolu R* (30 + 50), upraví se pH roztoku na hodnotu 4 za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* nebo *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *fuchsinu RS* a nechá se stát 30 min. Zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně přidáním 1,0 ml *fuchsinu RS* ke směsi 1,5 ml základního *roztoku acetaldehydu (100 μg C_2H_4O/ml)*, 4 ml *2-propanolu R* a 4,5 ml *vody R* (0,15 %, počítáno jako C_2H_4O).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)* a 5 ml *lihu 96% R*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R*. Přidá se 0,2 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení.

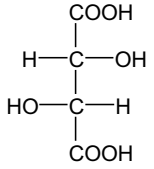
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,21 mg $C_6H_8O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Acidum tartaricum

Kyselina vinná



$C_4H_6O_6$ M_r 150,09 CAS 87-69-4

Je to kyselina (2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxybutandiová.
Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_6O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je velmi snadno rozpustná ve vodě a snadno rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je silně kyselý *(2.2.4)*.

B. Vyhovuje zkoušce na vínany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +12,0° až +12,8°; měří se roztok připravený rozpuštěním 5,00 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25 ml.

Kyselina šťavelová. 0,80 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 1 g *zinku R* granulovaného, směs se 1 min vaří a nechá se 2 min stát. Tekutina se převede do zkumavky, ve které je 0,25 ml roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l), zahřeje se k varu a rychle se ochladí. Pak se převede do odměrného válce, kam se přidá stejný objem *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,25 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (50 g/l), protřepe se a nechá se 30 min stát. Růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení současně připraveného porovnávacího roztoku obsahujícího 4 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (0,1 g/l) (350 μg/g, počítáno jako kyselina šťavelová bezvodá).

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. K 5 ml roztoku S se přidá 10 ml roztoku *octanu sodného R* (50 g/l) ve *vodě destilované R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,2 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

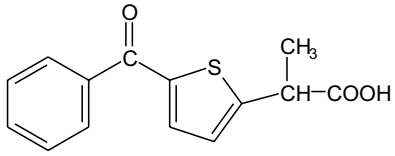
Stanovení obsahu

0,650 g se rozpustí v 25 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 75,05 mg $C_4H_6O_6$.

† Acidum tiaprofenicum

Kyselina tiaprofenová



$C_{14}H_{12}O_3S$ M_r 260,31 CAS 33005-95-7

Je to kyselina (*RS*)-2-(5-benzoyl-2-thienyl)propanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{14}H_{12}O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, snadno rozpustná v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 95 °C až 99 °C.

B. 25,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové v lihu RS* a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou v lihu RS* na 50,0 ml. Měří se absorbance roztoku při 220 nm až 350 nm *(2.2.25)*; roztok vykazuje absorpční maximum při 305 nm a prodlevu při 262 nm. Specifická absorbance v maximu je 550 až 590.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *kyseliny tiaprofenové CRL.*

D. Provede se tenkovstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg zkoušené látky se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *kyseliny tiaprofenové CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *ketoprofenu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 2 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 10 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové R, dichlormethanu R* a *acetonu R* (1 + 20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené hlavní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Optická otáčivost (*2.2.7*). -0,05° až +0,05°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g zkoušené látky v *ethylacetatu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *kyseliny tiaprofenové nečistoty C CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí porovnávacím roztokem (c) na 2,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *vody R, kyseliny octové ledové R, hexanu R* a *dichlormethanu R* (0,25 + 20 + 500 + 500), s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Nejdříve se přidá voda ke kyselině octové, potom hexan a nakonec dichlormethan. Směs se vloží na 2 min do ultrazvukové lázně. Během analýzy se směs neodplyňuje heliem,
- spektrofotometrického detektoru, 250 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (d). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou relativní retenční časy vztažené na kyselinu tiaprofenovou následující: kyseliny tiaprofenové nečistoty A 0,19; kyseliny tiaprofenové nečistoty B 0,43; kyseliny tiaprofenové nečistoty C 0,86. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je rozlišení mezi píky odpovídajícími kyselině tiaprofenové a kyselině tiaprofenové nečistotě C nejméně 3,0.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a), 20 µl porovnávacího roztoku (b) a 20 µl porovnávacího roztoku (c). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času kyseliny tiaprofenové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího kyselině thiaprofenové nečistotě C není větší než plocha

odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku nečistoty C, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %); součet ploch všech píků, kromě plochy hlavního píku a plochy píku nečistoty C, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g zkoušené látky vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb).*

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h ve vakuové sušárně při 60 °C a tlaku nejvýše 0,7 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g zkoušené látky se rozpustí v 25 ml *lihu 96% R.* Přidá se 25 ml *vody R* a 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS.*

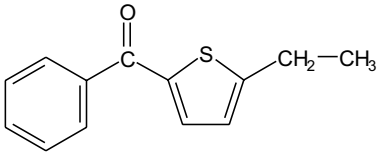
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,03 mg $C_{14}H_{12}O_3S$.

Uchovávání

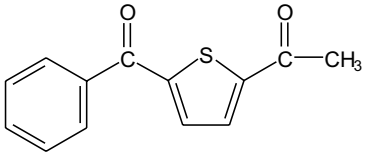
V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Separandum.

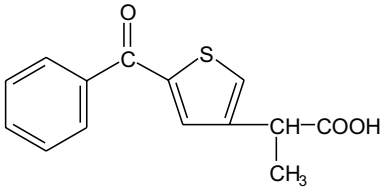
Nečistoty



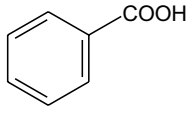
A. (5-ethyl-2-thienyl)fenylketon,



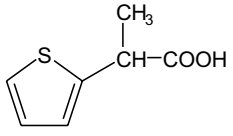
B. (5-acetyl-2-thienyl)fenylketon,



C. kyselina (*RS*)-2-(5-benzoyl-3-thienyl)propionová,



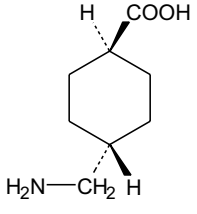
D. kyselina benzoová,



E. kyselina (*R,S*)-2-(2-thienyl)propionová.

† Acidum tranexamicum

Kyselina tranexamová



$C_8H_{15}NO_2$ M_r 157,21 CAS 1197-18-8

Je to kyselina *trans*-4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{15}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě a v kyselině octové ledové, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kyseliny tranexamové CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,2 g se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, přidá se 5 ml *vody R* a 0,2 ml *benzoylchloridu R*, silně se 10 min protřepává a upraví se pH na hodnotu 4 *kyselinou chlorovo-*

díkovou zředěnou RS. Pak se roztok zfiltruje, zbytek na filtru se promyje 5 ml *etheru R* a vysuší při 50 °C za sníženého tlaku. Teplota tání *(2.2.14)* je 184 °C až 187 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,5 až 8,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *kyseliny tranexamové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kyseliny tranexamové nečistoty A CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se smíchá s 2 ml porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 80) po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *ninhydrinem RS* a 15 min se zahřívá při 130 °C. Žádná skvrna odpovídající nečistotě kyseliny tranexamové a žádná skvrna s hodnotou R_F menší než hodnota R_F hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Kyselina *cis*-4-(aminomethyl)cyklohexankarbonová. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v 1 ml roztoku *kyseliny borité R* (6 g/l), přidají se 4 ml roztoku *1-fluor-2-nitro-4-trifluormethylbenzenu R* (100 g/l) v *dimethylsulfoxidu R* a 10 min se třepe. Pak se přidá 50 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 5% (*V/V*) a protřepe se dvakrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové vrstvy se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí ve 2,0 ml *chloroformu prostého ethanolu R*.
Kontrolní roztok. Připraví se stejně jako zkoušený roztok, ale bez zkoušené látky.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem prostým ethanolu R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé s vnitřním průměrem 4 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *chloroformu prostého ethanolu R* a *hexanu R* (1 + 80 + 120), s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 420 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku a nastaví se citlivost tak, že výška hlavního píku na chromatogramu je nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek je relativní retenční čas kyseliny *cis*-4(aminomethyl)cyklohexankarboxylové vzhledem ke kyselině tranexamové 0,8. Pak se nastříkne 20 μl každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku s retenčním časem menším než hlavní pík větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a zkoumadel.

Bromidy. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. K 15 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a směs se převede do zkumavky obsahující 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2*. Nechá se 5 min stát za chránění před světlem. Zkoušený roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 15 ml roztoku *bromidu draselného R* (0,005 g/l) (670 μg/g, počítáno jako bromid). Roztoky se hodnotí ze strany proti tmavému pozadí.

Těžké kovy *(2.2.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,140 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Přidá se 0,1 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny modrofialového zbarvení na modrozelené.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,72 mg $C_8H_{15}NO_2$.

Uchovávání

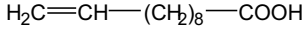
V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Nečistoty

A. kyselina *trans,trans*-4,4′-(iminodimethylen)di(cyklohexankarboxylová),
B. kyselina *cis*-4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylová.

Acidum undecylenicum

Kyselina undecylenová



$C_{11}H_{20}O_2$ M_r 184,28 CAS 112-38-9

Je to kyselina 10-undecylenová. Obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{11}H_{20}O_2$.

Vlastnosti

Bílá nebo světle žlutá krystalická hmota nebo bezbarvá nebo světle žlutá kapalina. Je prakticky nerozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96%, v etheru, v tucích a v silicích.

Zkoušky totožnosti

A. Index lomu *(2.2.6)*. 1,447 až 1,450; stanoví se při (25 ± 0,5) °C.

B. Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 21 °C až 24 °C.

C. K 2,0 g se přidají 2 ml čerstvě předestilovaného *anilinu R* a směs se 10 min vaří pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 30 ml *etheru R*, třikrát se protřepe vždy s 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a potom s 20 ml *vody R*. Organická vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni a zbytek se dvakrát rekrystalizuje *lihem R* 70% *(V/V)* a pak se suší 3 h ve vakuu; teplota tání *(2.2.14)* je 66 °C až 68 °C.

D. 0,1 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 5 ml *kyseliny octové ledové R*. Potom se přidá po kapkách 0,25 ml *manganistanu draselného RS*; roztok se odbarví.

Zkoušky na čistotu

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 10.

Vázané a minerální oleje. K 1,0 g se přidá 5 ml *uhličitanu sodného RS* a 25 ml *vody R* a 3 min se vaří. Horký roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Kyseliny rozpustné ve vodě. K 1,0 g se přidá 20 ml *vody R* zahřáté na 35 °C až 45 °C a 2 min se třepe. Po ochlazení se vodná vrstva zfiltruje přes navlhčený filtr. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stupeň nenasycenosti. 85,0 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 30 ml *kyseliny octové ledové R*. Titruje se *bromičnanem draselným 0,0167 mol/l VS* do odbarvení červeného zbarvení za použití 0,5 ml *ethoxychrysoidiniumchloridu RS* jako indikátoru přidaného na konci titrace. Spotřeba *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* je 8,9 ml až 9,4 ml.

Stanovení obsahu

0,750 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,5 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru do vzniku růžového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,5 mol/l VS* odpovídá 92,14 mg $C_{11}H_{20}O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených nekovových obalech, chráněna před světlem, na chladném místě.

† Aconiti radix

N

Omějový kořen

Synonyma. Radix aconiti, Tuber aconiti

Je to usušená hlíza druhů z okruhu *Aconitum napellus* L. Obsahuje nejméně 0,8 % alkaloidů rozpustných v etheru, počítáno jako akonitin ($C_{34}H_{47}NO_{11}$; M_r 645,8), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Mateřská hlíza řepovitého tvaru, 4 cm až 10 cm dlouhá, o průměru 1 cm až 3 cm, na povrchu tmavohnědá, vrásčitá, někdy se zbytky četných tenkých postranních kořínků; dceřiná hlíza světlejší, nahoře s krátkým osním pupenem; na povrchu hladká nebo jen lehce zvrásněná, s ojedinělými jizvami po postranních kořenech.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky tmavě hnědého metadermu; úlomky parenchymu; jednotlivá škrobová zrna, okrouhlá, o průměru až 18 μm; řidčeji škrobová zrna o průměru až 30 μm, se štěrbinovitou nebo hvězdicovitou trhlinou; šroubovitě, síťovitě nebo tečkovitě ztlustlé cévy, jednotlivě nebo ve skupinách; drobné skupinky sítkovic s úzkým luminem; jednotlivé obdélníkovité až čtvercovité, zřetelně tečkované sklereidy.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. Filtrát ze zkoušky Stanovení obsahu.
Porovnávací roztok. 15 mg *akonitiniumnitratu R* se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů *chloroformu R* a *2-propanolu R* (2 + 1).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a vyvíjí se ještě jednou za výše uvedených podmínek. Pak se vrstva suší 10 min při 110 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další, méně intenzivní skvrny. Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku; na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 5 % zčernalé drogy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 7,0 %.

Stanovení obsahu

10,000 g práškované drogy (355) se v kuželové baňce na 250 ml smíchá se 100,0 g *etheru prostého peroxidických látek R*, 2,0 ml *amoniaku zředěného RS1* a 3 ml *vody R* a protřepává se intenzivně 30 min. Pak se přidá 5 ml *vody R* a znovu se intenzivně protřepe. Po usazení částic drogy se rychle zfiltruje přes chomáček vaty, nálevka se během filtrace přikryje hodinovým sklem.
Filtrát se použije i ve Zkoušce totožnosti C.

40,00 g filtrátu (odpovídá 4,00 g drogy) se ve 150ml baňce odpaří ve vodní lázni při 40 °C do sucha. Odparek se smíchá dvakrát s 5,0 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a odpaří se ve vodní lázni při 40 °C do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml *lihu 96% R*, smíchá se s 30 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,1 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,02 mol/l VS* do vzniku slabě červenofialového zbarvení.

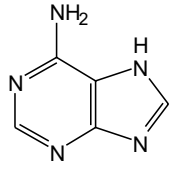
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* odpovídá 12,91 mg alkaloidů rozpustných v etheru, počítáno jako akonitin ($C_{34}H_{47}NO_{11}$).

Uchovávání

Ve velmi dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Adeninum

Adenin



$C_5H_5N_5$ M_r 135,13 CAS 73-24-5

Je to (7*H*-purin-6-yl)amin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_5N_5$.

Vlastnosti

Bílý prášek, velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích minerálních kyselin a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *adeninu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. K 1 g se přidá 3,5 ml *anhydridu kyseliny propionové R* a vaří se za míchání 15 min. Po ochlazení se k vzniklé krystalické hmotě přidá 15 ml *etheru petrolejového R* a směs se uvede za silného míchání do varu. Po ochlazení se zfiltruje a sraženina se dvakrát promyje 5 ml *etheru petrolejového R*, rozpustí se v 10 ml *vody R* a vaří se 1 min. Směs se zfiltruje při 30 °C až 40 °C a nechá se zchladnout. Vzniklá sraženina se odfiltruje a suší se 1 h při 100 °C až 105 °C; teplota tání *(2.2.14)* je 237 °C až 241 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se suspenduje v 50 ml *vody destilované R* a 3 min se vaří. Po ochlazení se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml a zfiltruje se. Filtrát se použije jako roztok S.

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 50 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je modrý. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je žlutý.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v *kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *kyselinou octovou zředěnou RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *adeninu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v *kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *kyselinou octovou zředěnou RS* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *adeninu CRL* a 10 mg *adenosinu R* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v *kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 12 cm. Po vysušení proudem teplého vzduchu se vrstva prohlíží v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 3 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a zfiltruje se. Sraženina se promyje malým množstvím *vody R* a filtrát se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g). Při zkoušce se místo 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* přidají 2 ml této kyseliny.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm položených okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí *papír lakmusový červený R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 0,5 g upráškované zkoušené látky se umístí na spodní hodinové sklíčko a suspenduje se v 0,5 ml *vody R*. K suspenzi se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s lakmusovým papírem se přiklopí na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zabarven než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,05 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nevýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve směsi 20 ml *acetanhydridu R* a 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciomerické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,51 mg $C_5H_5N_5$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Adeps lanae

Tuk z ovčí vlny

Synonymum. Cera lanae, vosk z ovčí vlny

CAS 8006-54-0

Je to čištěná bezvodá voskovitá látka získaná z ovčí vlny *(Ovis aries)*. Může obsahovat nejvýše 200 μg/g butylhydroxytoluenu.

Vlastnosti

Slabě žlutá mastná hmota, taví se na čirou nebo prakticky čirou žlutou tekutinu. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etheru a těžce rozpustný ve vroucím ethanolu. Roztok v etheru petrolejovém opalizuje.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *chloroformu R* a přidá se 1 ml *acetanhydridu R* a 0,1 ml *kyseliny sírové R*; vzniká zelené zbarvení.

B. 50 mg se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*, přidá se 5 ml *kyseliny sírové R* a protřepe se; vzniká červené zbarvení a ve spodní vrstvě se objeví intenzivní zelená fluorescence.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky rozpustné ve vodě. 5,0 g se roztaví na vodní lázni, přidá se 75 ml *vody R* zahřáté na 90 °C až 95 °C a 2 min se silně protřepává. Po ochlazení se zfiltruje navlhčeným filtrem. K 60 ml filtrátu, jenž nemusí být čirý, se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* nebo *0,15 ml hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Teplota skápnutí *(2.2.17)*. 38 °C až 44 °C. Zkoušená látka se roztaví na vodní lázni, ochladí se na teplotu asi 50 °C, naleje se do kovové nádobky přístroje na stanovení teploty skápnutí a nechá se stát 24 h při teplotě 15 °C až 20 °C.

Emulgační schopnost. Zkoušená látka přijme nejméně 20 ml *vody R*. K 10 g v třecí misce se přidává *voda R* z byrety po 0,2 ml až 0,5 ml. Po každém přidání *vody R* se obsah třecí misky intenzivně promíchá, aby došlo k úplnému pojmutí *vody R*. Když jsou viditelné kapky vody, kterou již zkoušená látka nepojímá, je zkouška ukončena.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; 5,0 g se rozpustí v 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 20.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 90 až 105; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky. Zahřívá se 4 h pod zpětným chladičem.

Oxidovatelné látky rozpustné ve vodě. K 10 ml filtrátu ze zkoušky Kysele nebo zásaditě reagující látky rozpustné ve vodě se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS*; po 10 min se roztok zcela neodbarví.

Butylhydroxytoluen. Nejvýše 200 μg/g. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*. Jako vnitřní standard se použije *methyldekanoat R*.

Roztok vnitřního standardu. 0,2 g *methyldekanoatu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí v *sirouhlíku R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,2 g *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*; předřadí se kolona naplněná silanizovanou skelnou vatou,
- *dusíku pro chromatografii R* při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota vstřikovacího prostoru je 180 °C a teplota detektoru je 300 °C. Nastřikují se zvolené objemy zkoušených roztoků (a) a (b) a zvolený objem porovnávacího roztoku.

Parafiny. *Uzávěr sloupce a vatová zátka se zbaví tuku*. Připraví se sloupec bezvodého oxidu hlinitého 230 mm dlouhý o průměru 20 mm naplněním řídkou směsí *oxidu hlinitého bezvodého R* a *etheru petrolejového R1* do skleněné trubice opatřené uzávěrem. Směs se nechá usadit tak, aby rozpouštědlo nad sloupcem tvořilo vrstvu asi 40 mm. 3,0 g zkoušené látky se rozpustí v 50 ml teplého *etheru petrolejového R1*, ochladí se a roztok se nechá prokapávat přes sloupec rychlostí 3 ml/min. Potom se sloupec promyje 250 ml *etheru petrolejového R1*. Eluáty se spojí, předestilují, odpaří se na vodní lázni a zbytek se suší 10 min při 105 °C tak dlouho, až dvě po sobě následující vážení se neliší o více než 1 mg. Zbytek váží nejvýše 30 mg (1,0 %).

Chloridy. Nejvýše 150 μg/g. 1,0 g se 5 min vaří s 20 ml *lihu R* 90% *(V/V)* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 40 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,15 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (10 g/l) v *lihu R* 90% *(V/V)* a roztok se ponechá 5 min chráněn před světlem. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně přidáním 0,15 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (10 g/l) v *lihu R* 90% *(V/V)* ke směsi 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l RS*, 20 ml *lihu R* 90% *(V/V)*, 40 ml *vody R* a 0,5 ml *kyseliny dusičné R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,15 %; 5,00 g zkoušené látky se spálí a se zbytkem se provede zkouška na síranový popel.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede koncentrace butylhydroxytoluenu, pokud byl přidán.

Adeps lanae cum aqua

Lanolin

Synonyma. Cera lanae hydrosa, Adeps lanae hydrosus

Je to směs 75 % tuku z ovčí vlny a 25 % vody. Získává se postupným přidáváním vody k roztavenému tuku z ovčí vlny za stálého míchání. Může obsahovat nejvýše 150 μg/g butylhydroxytoluenu.

Vlastnosti

Slabě žlutá mastná hmota.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *chloroformu R* a přidá se 1 ml *acetanhydridu R* a 0,1 ml *kyseliny sírové R*; vzniká zelené zbarvení.

B. 50 mg se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*, přidá se 5 ml *kyseliny sírové R* a protřepe se; vzniká červené zbarvení a ve spodní vrstvě se objeví intenzivní zelená fluorescence.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky rozpustné ve vodě. 6,7 g se rozpustí na vodní lázni, přidá se 75 ml *vody R* zahřáté na 90 °C až 95 °C a 2 min se silně protřepává. Po ochlazení se zfiltruje navlhčeným filtrem. K 60 ml filtrátu, jenž nemusí být čirý, se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* nebo *0,15 ml hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS.*

Teplota skápnutí *(2.2.17)*. 38 °C až 44 °C. Část zbytku získaného ve zkoušce Obsah tuku z ovčí vlny se roztaví na vodní lázni, ochladí se na teplotu asi 50 °C, naleje se do kovové nádobky přístroje na stanovení teploty skápnutí a nechá se stát 24 h při teplotě 15 °C až 20 °C.

Emulgační schopnost. Zkoušená látka přijme nejméně 20 ml *vody R*. 10 g zbytku získaného ve zkoušce Obsah tuku z ovčí vlny se přenese do třecí misky a přidává se z byrety *voda R* po 0,2 ml až 0,5 ml. Po každém přidání se obsah třecí misky intenzivně promíchá, aby došlo k úplnému pojmutí *vody R*. Když jsou viditelné kapky vody, kterou již zkoušená látka nepojímá, je zkouška ukončena.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 0,8; 5,0 g se rozpustí v 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 15.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 67 až 79; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky. Zahřívá se 4 h pod zpětným chladičem.

Oxidovatelné látky rozpustné ve vodě. K 10 ml filtrátu ze zkoušky Kysele nebo zásaditě reagující látky rozpustné ve vodě se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS*; do 10 min se roztok zcela neodbarví.

Butylhydroxytoluen. Nejvýše 150 μg/g. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*. Jako vnitřní standard se použije *methyldekanot R*.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g zbytku získaného ve zkoušce Obsah tuku z ovčí vlny se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g zbytku získaného ve zkoušce Obsah tuku z ovčí vlny se rozpustí v *sirouhlíku R*, přidá se 1,0 ml vnitřního standardu a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,2 g *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*; předřadí se kolona naplněná silanizovanou skelnou vatou,
- *dusíku pro chromatografii R* při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 180 °C a teplota detektoru na 300 °C. Nastřikují se zvolené objemy zkoušených roztoků (a) a (b) a zvolený objem porovnávacího roztoku.

Parafiny. *Uzávěr sloupce a vatová zátka se zbaví tuku*. Připraví se sloupec bezvodého oxidu hlinitého 230 mm dlouhý o průměru 20 mm naplněním řídkou směsí *oxidu hlinitého bezvodého R* a *etheru petrolejového R1* do skleněné trubice opatřené uzávěrem. Směs se nechá usadit tak, aby rozpouštědlo nad sloupcem tvořilo vrstvu asi 40 mm. 3,0 g zbytku získaného ve zkoušce Obsah tuku z ovčí vlny se rozpustí v 50 ml teplého *etheru petrolejového R1*, ochladí se a roztok se nechá prokapávat přes sloupec rychlostí 3 ml/min. Potom se sloupec promyje 250 ml *etheru petrolejového R1*. Eluáty se spojí, předestilují, odpaří se na vodní lázni a zbytek se suší v intervalech trvajících 10 min při 105 °C tak dlouho, až dvě po sobě následující vážení se neliší o více než 1 mg. Zbytek váží nejvýše 30 mg (1,0 %).

Chloridy. Nejvýše 115 μg/g; 1,3 g se 5 min vaří s 20 ml *lihu R* 90% *(V/V)* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 40 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,15 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (10 g/l) v *lihu R* 90% *(V/V)* a roztok se ponechá 5 min chráněn před světlem. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně přidáním 0,15 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (10 g/l) v *lihu R* 90% *(V/V)* ke směsi 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l RS*, 20 ml *lihu R* 90% *(V/V),* 40 ml *vody R* a 0,5 ml *kyseliny dusičné R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; 5,00 g zkoušené látky se spálí a se zbytkem se provede zkouška na síranový popel.

Obsah tuku z ovčí vlny. 72,5 % až 77,5 %. 30,0 g zkoušené látky se ve vhodné, předem zvážené nádobě zahřívá na vodní lázni za stálého míchání do konstantní hmotnosti. Zbytek se zváží.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede koncentrace butylhydroxytoluenu, pokud byl přidán.

Adeps lanae hydrogenatus

Ztužený tuk z ovčí vlny

Synonymum. Cera lanae hydrogenata, vosk z ovčí vlny ztužený

CAS 8031-44-5

Je to směs vyšších alifatických alkoholů a sterolů získaných hydrogenací bezvodého tuku z ovčí vlny za vysokého tlaku a teploty. Estery a kyseliny tuku z ovčí vlny jsou redukovány na jim odpovídající alkoholy. Může obsahovat nejvýše 200 μg/g butylhydroxytoluenu.

Vlastnosti

Bílá nebo světle žlutá mazlavá hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etheru petrolejovém a ve vroucím lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Mastné alkoholy a steroly, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas a velikost hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají přibližně hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 50 mg se rozpustí v 5 ml *dichlormethanu R*, smíchá se s 1 ml *acetanhydridu R* a 0,1 ml *kyseliny sírové R*; vznikne zelené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Teplota tání *(2.2.15)*. 45 °C až 55 °C. Nechá se stát 16 h při 20 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. 140 až 180.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 8,0. 2,00 g se zahřívají 4 h pod zpětným chladičem.

Mastné alkoholy a steroly. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v 60 ml *ethanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,25 g *ztuženého tuku z ovčí vlny CRL* se rozpustí v 60 ml *ethanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,25 mm se stěnou pokrytou vrstvou 0,25 μm *polydimethylsiloxanu R* nebo jinou nepolární fází,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při tlaku 100 kPa,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje po nástřiku 5 min při 100 °C, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min až na 300 °C, při níž se udržuje 15 min. Teploty nástřikového prostotu se udržuje při 325 °C a teplota detektoru při 350 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztoku. Chromatogram zkoušeného roztoku se významně neliší od chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou patrné píky cizích alkoholů a sterolů.

Butylhydroxytoluen. Nejvýše 200 μg. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *methyldekanoatu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,20 g *methyldekanoatu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí v *sirouhlíku R*, přidá se 1,0 ml *roztoku vnitřního standardu* a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,2 g *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml *roztoku vnitřního standardu* a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*; předřadí se kolona naplněná silanizovanou skelnou vatou,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota nástřikového prostoru na 180 °C a teplota detektoru na 300 °C. Nastříkne se odpovídající množství zkoušeného roztoku (a) a zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 2,000 g se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,1 %.

Uchovávání

Ve zcela naplněných obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede koncentrace butylhydroxytoluenu, pokud byl přidán.

Adeps solidus

Ztužený tuk

Je to směs mono-, di- a triacylglycerolů, která se získává esterifikací mastných kyselin přírodního původu s glycerolem nebo transesterifikací tuků přírodního původu. Různé druhy ztuženého tuku se liší svou teplotou tání, svým číslem hydroxylovým a číslem zmýdelnění. Neobsahuje žádná aditiva.

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá voskovitá křehká hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v etheru a těžce rozpustný v ethanolu. Zahřátím na 50 °C se taví za vzniku bezbarvé nebo slabě žluté tekutiny.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *dichlorethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanesou 2 μl zkoušeného roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlorethanu R* (10 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se parám jodu do vzniku skvrn a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu je patrná skvrna o R_F asi 0,6 odpovídající triacylglycerolům (R_{st} 1), skvrna odpovídající 1,3-diacylglycerolům (R_{st} 0,5) a skvrna odpovídající 1,2-diacylglycerolům (R_{st} 0,3). Dále může být patrná skvrna odpovídající 1-monoacylglycerolům (R_{st} 0,05).

Zkoušky na čistotu

Zásadité nečistoty. 2,00 g se rozpustí ve směsi 1,5 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *etheru R* a přidá se 0,05 ml *modři bromfenolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Teplota tání *(2.2.15)*. 30 °C až 45 °C; teplota tání se liší od deklarované hodnoty nejvýše o 2 °C. Roztavená látka se vpraví do kapiláry a nechá se stát 24 h při teplotě nižší než 10 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 0,5; 5,0 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Nejvýše 50; nalezená hodnota se liší od deklarované nejvýše o 5 jednotek. Pokud je deklarovaná hodnota menší než 5, nalezená hodnota je nejvýše 5.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 3.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 3.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 210 až 260; stanoví se s 2,0 g zkoušené látky. Nalezená hodnota se liší od deklarované nejvýše o 5 %.

Nezmýdelnitelné látky *(2.5.7)*. Nejvýše 0,6 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,05 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Chráněn před světlem a teplem.

Označování

V označení na obalu se uvedou následující údaje:
- deklarovaná teplota tání,
- deklarované číslo hydroxylové,
- deklarované číslo zmýdelnění.

Adeps suillus

N

Vepřové sádlo

CAS 61789-99-9

Je to tuk získávaný tavením při 75 °C až 100 °C čerstvé zdravé tukové tkáně zbavené vody a bílkovin druhu *Sus scrofa* L. var. *domesticus* GRAY.

Výroba

Zvířata, ze kterých je tuk získáván, musí splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro lidskou konzumaci.

Vlastnosti

Homogenní bílá nebo lehce nažloutlá snadno roztíratelná hmota bez pachu nebo téměř bez pachu. Je prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v etheru a v etheru petrolejovém, těžce rozpustné v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

50 g se v porcelánové misce o průměru 8 cm roztaví na vodní lázni a pak se rychle ochladí; na okrajích ztuhlé taveniny vznikne paprskovité vrásnění a uprostřed hladká prohloubenina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. 10 g se roztaví při 90 °C; tavenina je čirá *(2.2.1)* a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Pach. 20 g se převede do porcelánového kelímku o průměru 7 cm a výšce asi 6 cm a zahřívá se nad plamenem až do vzniku prvních namodralých par (160 °C až 170 °C). Během zahřívání nevzniká žluklý, ztuchlý nebo cizí pach. Horká tavenina se z kelímku vyleje; pach zbytku látky v kelímku se neliší od pachu dříve zjištěného.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,458 až 1,461; stanoví se při 40 °C.

Teplota tání, metoda otevřené kapiláry *(2.2.15)*. 36 °C až 43 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,3.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 46 až 60.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 4.

Nezmýdelnitelné látky *(2.5.7)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Voda. Nejvýše 0,3 %. 10 g se převede do silnostěnné zkumavky výšky 90 mm a objemu asi 18 ml uzavřené pryžovou zátkou, jejímž středem je do zkumavky zaveden teploměr tak, aby rtuťová nádržka teploměru byla uprostřed zkoušené látky. Pak se zkoušená látka opatrně roztaví ve vodní lázni při 50 °C až 90 °C; roztavená látka je čirá *(2.2.1)*. Pak se zkumavka vyjme z vodní lázně a nechá se pomalu chladnout za intenzivního protřepávání; zkoušená látka se kalí při teplotě nižší než 75 °C (odpovídá 0,3 %). Zkouška se opakuje třikrát.

Rozložený tuk.

a) Látka nepáchne ani nechutná žlukle.
b) 2 g zfiltrované látky se převedou do kuželové baňky s dlouhým hrdlem, smíchá se s 10 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS,* baňka se přikryje hodinovým sklem a zahřívá se přesně 2 min. Pak se směs převede pomocí *lihu 96% R* do odměrné baňky, přidají se 3 ml *vody R*, směs se rychle ochladí na 20 °C a zředí se *lihem 96% R* na 25 ml. Po 10 min, včetně 2 min zahřívání, není 10 ml roztoku zbarveno intenzivněji než 10 ml porovnávacího barevného roztoku $Ž_3$ (*2.2.2, Metoda II*).

Uchovávání

V dobře uzavřených a zcela naplněných obalech, při teplotě 5 °C až 15 °C, chráněno před světlem.

Je použitelné nejvýše 21 dnů.

Aer medicalis

1998

Medicinální vzduch

Je to stlačený okolní vzduch obsahující 20,4 % (*V/V*) až 21,4 % (*V/V*) kyslíku (O_2).

Vlastnosti

Bezbarvý plyn, bez pachu. Při 20 °C a tlaku 101 kPa se 1 objemový díl plynu rozpustí v asi 50 objemových dílech vody.

Výroba

Oxid uhličitý. Nejvýše 500 ml/m^3; stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.24)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.
Porovnávací plyn (a). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R* obsahujícího nejvýše 1 ml/m^3 *oxidu uhličitého R1*.
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R* obsahujícího 500 ml/m^3 *oxidu uhličitého R1*.

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhličitého ve zkoušeném plynu.

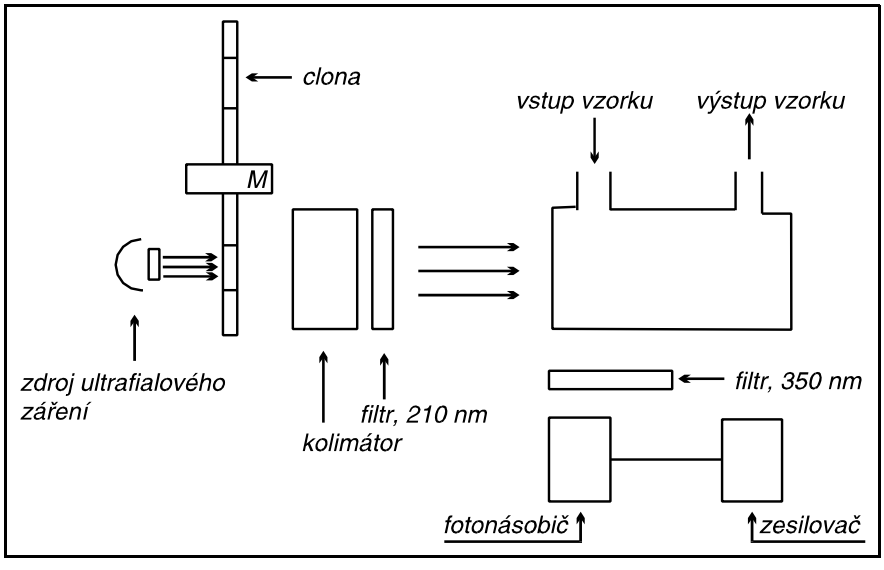
Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.25)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.

Porovnávací plyn (a). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R* obsahujícího nejvýše 1 ml/m^3 *oxidu uhelnatého R.*
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R* obsahujícího 5 ml/m^3 *oxidu uhelnatého R.*

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhelnatého ve zkoušeném plynu.

Oxid siřičitý. Nejvýše 1 ml/m^3; stanoví se za použití ultrafialového fluorescenčního analyzátoru, viz obrázek 1.



Obr. 1. Ultrafialový fluorescenční analyzátor

Zařízení se skládá:
- z přístroje emitujícího ultrafialové záření o vlnové délce 210 nm, sestaveného z ultrafialové lampy, kolimátoru a selektivního filtru; paprsek je periodicky přerušován clonou rotující velkou rychlostí,
- z reakční komory, kterou proudí zkoušený plyn,
- z přístroje detegujícího záření emitované při 350 nm, sestaveného ze selektivního filtru, fotonásobiče a zesilovače.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována.
Porovnávací plyn (a). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R.*
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R* obsahujícího 0,5 ml/m^3 až 2 ml/m^3 *oxidu siřičitého R1.*

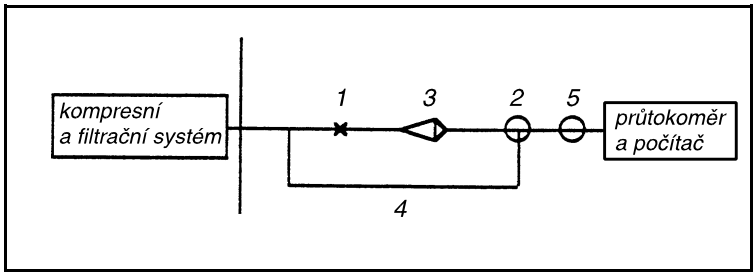
Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu siřičitého ve zkoušeném plynu.

Olej. Nejvýše 0,1 mg/m^3; stanoví se za použití měřicího systému popsaného níže, viz obrázek 2.

Zařízení se skládá:
- z uzavíracího ventilu (1),
- z trojcestného ventilu (2),

- z kuželovité nádobky k zachycování oleje (3),
- z vedlejší cesty (4),
- z regulátoru tlaku (5),
- z průtokoměru (6),
- z filtru ze skleněných mikrovláken vyhovujícího následujícím požadavkům:
  - 100% borokřemičité sklo bez pojiv,
  - odolnost proti tepelnému působení při 500 °C (aby se vyloučily stopy organických látek),
  - 99,999% zadržovací účinnost pro částice NaCl o průměru 0,6 μm.

Celý přístroj se před použitím promyje trichlortrifluorethanem R prostým oleje a tuků.



Obr. 2. Měřicí systém pro olej

Do kuželovité nádobky k zachycování oleje (3) se umístí filtr ze skleněných mikrovláken. Ventil (1) se zavře, zkoušený plyn proplachuje vedlejší cestu (4), trojcestný ventil (2), regulátor tlaku (5) a průtokoměr (6). Zavře se vstupní ventil kompresního a filtračního systému: otevře se ventil (1) a trojcestný ventil (2) se otočí tak, aby umožňoval průchod plynu mezi kuželovitou nádobkou a regulátorem tlaku. Otevře se vstupní ventil kompresního a filtračního zařízení a regulátor tlaku (5) se nařídí tak, aby průtok zaznamenaný průtokoměrem (6) byl 20 l/min. Systémem se nechá projít 100,0 l zkoušeného plynu.

Filtr ze skleněných mikrovláken se vyjme a umístí se do vzduchotěsného obalu. Opatrně se rozřeže a kousky se vloží do 25,0 ml *trichlortrifluorethanu R* (zkoušený roztok).

Připraví se řada porovnávacích roztoků obsahujících 0,05 μg/ml až 0,5 μg/ml oleje (použitého při mazání kompresního systému) v *trichlortrifluorethanu R*. Změří se absorbance zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků za použití infračerveného spektrofotometru při 2960,3 cm^{-1}, 2927,7 cm^{-1} a 2855,0 cm^{-1}. Absorbance oleje se získá sečtením těchto tří absorbancí. Použijí se kyvety s bromidem draselným o optické délce několika centimetrů.

Z absorbancí porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a stanoví se množství oleje.

Oxid dusnatý a oxid dusičitý. Celkem nejvýše 2 ml/m^3; stanoví se za použití chemiluminiscenčního analyzátoru *(2.5.26)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.

Porovnávací plyn (a). Směs obsahující 79 % (*V/V*) *dusíku R1* a 21 % (*V/V*) *kyslíku R* obsahujícího nejvýše 0,05 ml/m^3 oxidu dusnatého a oxidu dusičitého.

Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 2 ml/m^3 *oxidu dusnatého R* v *dusíku R1*.

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu dusnatého a oxidu dusičitého ve zkoušeném plynu.

Voda. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití elektrolytického hygrometru *(2.5.28)*.

Stanovení obsahu. Stanoví se obsah kyslíku za použití paramagnetického analyzátoru *(2.5.27)*.

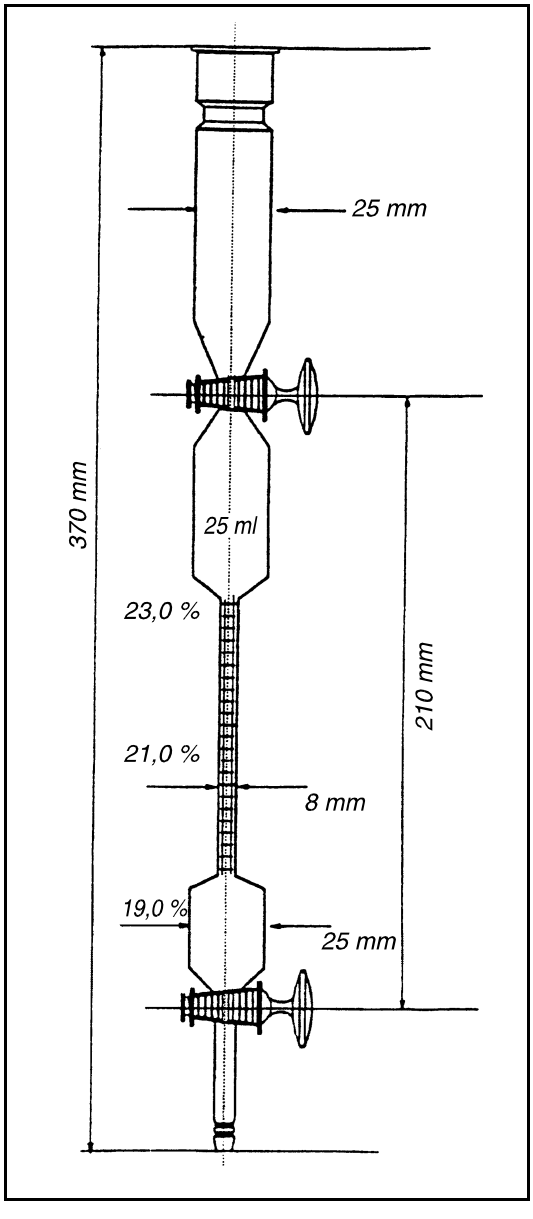
Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A a B, viz Obecné zásady (1.2).

A. Doutnající dřevěná tříska se umístí do kuželové baňky s atmosférou zkoušeného plynu; tříska stále doutná.

B. Použije se plynová byreta, viz obrázek 3, o objemu 25 ml, jejíž střední válcovitá část je v rozmezí 19,0 % až 23,0 % dělena po 0,2 % a jejíž oba konce jsou opatřeny kuželovým kohoutem. K dolnímu kohoutu je napojena trubice opatřená olivkou, která slouží k přívodu plynu do byrety. Válcová nálevka nad horním kohoutem slouží k zavádění absorpčního roztoku do byrety. Byreta se promyje *vodou R* a vysuší se. Oba kohouty se otevřou, na dolní trubici s olivkou se připojí zdroj zkoušeného plynu a průtoková rychlost se nastaví na 1 l/min, byreta se promývá 1 min zkoušeným plynem. Nejprve se zavře dolní kohout, ihned potom i horní kohout a rychle se odpojí zdroj zkoušeného plynu. Rychle se pootevře horní kohout, aby v byretě nebyl žádný přetlak. Válcová nálevka byrety uchycená ve svislé poloze se naplní čerstvě připravenou směsí složenou z 21 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (560 g/l) a 130 ml roztoku *dithioničitanu sodného R* (200 g/l). Horní kohout se pomalu otevře, roztok absorbuje kyslík a proniká do byrety. Nechá se bez třepání stát 10 min a odečte se hladina kapaliny v dělené části byrety; tato hodnota je 20,4 až 21,4 a odpovídá procentům (*V/V*) kyslíku.

C. Vyhovuje požadavkům zkoušky Stanovení obsahu.



Obr. 3. Plynová byreta

Zkoušky na čistotu

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhelnatého *(2.1.6)*.

Oxid siřičitý. Nejvýše 1 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu siřičitého *(2.1.6)*.

Olej. Nejvýše 0,1 mg/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oleje *(2.1.6)*.

Oxid dusnatý a oxid dusičitý. Nejvýše 2 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu dusnatého a oxidu dusičitého *(2.1.6)*.

Oxid uhličitý. Nejvýše 500 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhličitého *(2.1.6)*.
Vodní pára. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci vodní páry *(2.1.6)*.

Uchovávání

Jako plyn ve vhodných obalech vyhovujících ČSN 07 8510 nebo se odebírá z plynového potrubního rozvodu vyhovujícího ČSN 38 6473.

Nečistoty

A. oxid uhličitý,
B. oxid siřičitý,
C. oxid dusnatý,
D. oxid dusičitý,
E. olej,
F. oxid uhelnatý,
G. voda.

Agar

Agar

CAS 9002-18-0

Je to směs polysacharidů z různých druhů řas čeledi *Rhodophyceae*, zejména rodu *Gelidium*. Vyrábí se extrakcí řas vařící vodou. Výtažek se za horka zfiltruje, zahustí a usuší.

Vlastnosti

Agar má slizovitou chuť.

Vyskytuje se ve formě prášku nebo stlačených proužků 2 mm až 5 mm širokých nebo někdy ve vločkách. Je bezbarvý až světle žlutý, průsvitný, houževnatý, nesnadno lámavý, po usušení je křehčí.

Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

A. Pozoruje se pod mikroskopem. Proužky nebo vločky vložené do *jodu 0,005 mol/l RS* se částečně zbarví hnědofialově. Při stonásobném zvětšení jsou patrna četná drobná, bezbarvá, vejčitá nebo okrouhlá zrna na amorfním pozadí, ojediněle mohou být přítomny hnědé okrouhlé až vejčité spory, na povrchu síťovité, o průměru až 60 μm.

Je-li třeba, droga se upráškuje; prášek je žlutobílý. Pozoruje se pod mikroskopem v *jodu 0,005 mol/l RS*; prášek je tvořen hranatými úlomky s četnými zrny vzhledem podobnými těm, která lze pozorovat v proužcích a vločkách. Některé úlomky jsou zbarveny hnědofialově.

B. 0,1 g se rozpustí zahřátím v 50 ml *vody R*. Po ochlazení se k 1 ml slizu opatrně přidají 3 ml *vody R* tak, aby vznikly dvě oddělené vrstvy. Přidá se 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*. Rozhraní vrstev se zbarví tmavě hnědofialově. Po protřepání se tekutina zbarví světle žlutě.

C. 5 ml slizu ze Zkoušky totožnosti B se zahřívá 30 min na vodní lázni s 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1*. Do 30 min vznikne bílý zákal.

D. 0,5 g se rozpustí v 50 ml *vody R* zahřátím na vodní lázni. Zůstane pouze několik nerozpuštěných úlomků. Tekutina se nechá zvolna chladnout; při 35 °C až 30 °C přechází v gel. Tento gel při zahřívání na vodní lázni netaje při teplotě nižší než 80 °C.

Zkoušky na čistotu

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 10; nalezená hodnota se liší od deklarované hodnoty nejvýše o 10 %. Stanoví se s práškovanou drogou (355).

Nerozpustné látky. 5,00 g práškované drogy (355) se smíchá se 100 ml *vody R* a 14 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Vaří se mírně 15 min za častého míchání a za horka se zfiltruje předem zváženým filtrem ze slinutého skla (160). Filtr se promyje horkou *vodou R* a suší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 50 mg (1,0 %).

Želatina. 1,00 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni ve 100 ml *vody R* a ochladí se na 50 °C. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *trinitrofenolu RS*. Do 10 min nevznikne zákal.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 20,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 5,0 %.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^3 živých aerobních mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou (*2.6.12*). Vyhovuje zkoušce (*2.6.13)* na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede číslo bobtnavosti.

Agrimoniae herba

N

Řepíková nať

Synonymum. Herba agrimoniae

Je to usušená kvetoucí nať druhu *Agrimonia eupatoria* L. nebo *Agrimonia procera* WALLR. nebo směs obou druhů. Obsahuje nejméně 5,0 % tříslovin.

Vlastnosti

Droga slabě aromatického pachu, chuti mírně nahořklé, stahující.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek oblý, někdy až hranatý, zelený, hnědě naběhlý, roztroušeně žláznatý, s krycími chlupy různé délky, dutý. Listy přetrhovaně lichozpeřené, se třemi až šesti jařmy velkých a dvěma až třemi jařmy malých lístků. Na svrchní straně tmavozelené, na spodní straně světlejší, bělavě nebo šedě plstnaté s vyniklou žilnatinou. Lístky široce obvejčité až oválné, vroubkovaně až hrubě vroubkovaně zubaté nebo pilovité. Terminální lístek přisedlý až krátce řapíčkatý. Listeny listu trojlaločné. Květy pětičetné uspořádané ve vrcholovém přímém klasu. Květní stopky krátké se dvěma listenci. Koruna zlatožlutá, korunní lístky podlouhlé až obvejčité, většinou vykrojené.

Češule u druhu *Agrimonia eupatoria* za plodu čihovitá až do tří čtvrtin hluboce a úzce brázditá, přitiskle chlupatá, nežláznatá, vnitřní háčkovité štětiny vzpřímené, vnější šikmo odstálé; u druhu *Agrimonia procera* zvonkovitá, do jedné poloviny mělce a široce brázditá, se zřetelně vyvinutým terčíkem, dolní háčkovité štětiny dolů skloněné.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka listu z buněk se stěnami mnohohrannými až mírně vlnitě zprohýbanými. Krycí chlupy jednobuněčné, až několik milimetrů dlouhé, špičaté, silně ztlustlé, na povrchu bradavčité, se šroubovitě stočeným pruhem. Lumen vyplněno hnědým obsahem. Žláznaté chlupy několikabuněčné s jednobuněčnou až tříbuněčnou ohnutou nohou a s dvoubuněčnou až čtyřbuněčnou hlavičkou a s velmi drobnou, většinou jednobuněčnou nohou a velkou kulatou hlavičkou. (Výše uvedené typy chlupů se vyskytují i na stonku, kalichu a češuli.) Průduchy anomocytické (*2.8.3*), na spodní straně listu četnější. List bifaciální. V mezofylu až 50 μm velké krystaly (*A. eupatoria*) nebo drúzy (*A. procera*) šťavelanu vápenatého. Pylová zrna kulatá až oválná o průměru 50 μm s hladkou exinou a třemi klíčními póry.

C. Práškovaná droga. Prášek je šedozelený až hnědozelený. Droga je charakteristická těmito znaky: četné krycí a žlaznaté chlupy nebo jejich úlomky; úlomky listové čepele s anomocytickými průduchy (*2.8.3*); v mezofylu četné krystaly nebo drúzy šťavelanu vápenatého.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 2,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 20 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 5 mg *rutinu R*, 5 mg *hyperosidu R* a 5 mg *isokvercitrinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethylacetatu R* (10 +10 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pak se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku, nad skvrnou odpovídající isokvercitrinu je obvykle patrna oranžová skvrna (kvercitrosid). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrny další méně výrazné skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 %. Nejvýše 6 % plodů a nejvýše 5 % stonků silnějších než 5 mm.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %. 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

1,000 g práškované drogy (180) se v kuželové baňce smíchá se 150 ml *vody R*. Zahřeje se k varu a zahřívá se dalších 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje filtračním papírem o průměru 12 cm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Veškeré polyfenoly. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a roztokem *uhličitanu sodného R* (150 g/l) se zředí na 50,0 ml. Přesně 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_1) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neadsorbovatelné na kožní prášek. Ke 20,0 ml filtrátu se přidá 0,20 g *kožního prášku CRL* a 60 min se intenzivně protřepává, pak se zfiltruje. 10,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a roztokem *uhličitanu sodného R* (150 g/l) se zředí na 50,0 ml. Přesně 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_2) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Porovnávací roztok. 25,0 mg *pyrogallolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a roztokem *uhličitanu sodného R* (150 g/l) se zředí na 50,0 ml. Přesně 2 min po přidání posledního roztoku a do 15 min po rozpuštění pyrogallolu se měří absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 715 nm (A_3) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{13{,}12 \,.\, (A_1 - A_2)}{A_3 \,.\, m},$$

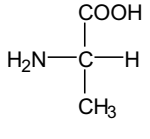
v němž značí:
m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Alaninum

Alanin



$C_3H_7NO_2$ M_r 89,09 CAS 56-41-7

Je to kyselina (*S*)-2-aminopropionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_3H_7NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *alaninu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,5 g se rozpustí ve směsi 1 ml *vody R*, 0,5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (100 g/l) a 0,25 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a protřepe se; vyvíjí se plyn. Pak se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,25 ml *jodu RS*. Po asi 30 min se tvoří žlutá sraženina s charakteristickým pachem.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +13,5° až +15,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *alaninu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *alaninu CRL* a 10 mg *glycinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku, vysuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm položených okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí *papír lakmusový červený R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní hodinové sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s lakmusovým papírem se přiklopí na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zabarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědožlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,91 mg $C_3H_7NO_2$.

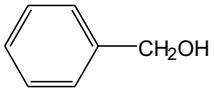
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Alcohol benzylicus

Benzylalkohol

Synonymum. Alcoholum benzylicum



C_7H_8O M_r 108,14 CAS 100-51-6

Je to fenylmethanol. Obsahuje 97,0 % až 100,5 % sloučeniny C_7H_8O.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá světlolámající olejovitá kapalina. Je dobře rozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96%, s chloroformem, s etherem, s mastnými oleji a se silicemi.

Zkoušky totožnosti

K 5 ml *manganistanu draselného RS* se přidá 0,1 ml zkoušené látky a 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*; vznikne charakteristický pach benzaldehydu.

Zkoušky na čistotu

Rozpustnost. 2 ml se třepou s 60 ml *vody R*; úplně se rozpustí za vzniku čirého roztoku *(2.2.1)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml se přidá 10 ml *lihu 96% R* a 1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,538 až 1,541.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,043 až 1,049.

Benzaldehyd a jiné příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. Použije se zkoušená látka.
Porovnávací roztok. 0,1 g *dibutylftalatu R* a 0,1 g *benzaldehydu R* se rozpustí ve zkoušené látce a zředí se jí na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R,* impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R*, s průtokovou rychlostí 20 ml/min jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se naprogramuje tak, aby vzrůstala od 85 °C do 290 °C rychlostí 10 °C/min. Teplota vstřikovacího prostoru se udržuje na 210 °C a teplota detektoru na 275 °C. 1 μl každého roztoku se nastříkne buď přímo na počátek kolony, nebo pomocí injektoru.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku odpovídajícího benzaldehydu větší než 1,5násobek plochy píku odpovídajícího dibutylftalatu na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,15 %); součet ploch píků, kromě píku odpovídajícího benzylalkoholu a benzaldehydu, není větší než dvojnásobek plochy píku odpovídajícího dibutylftalatu na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Látka určená pro výrobu parenterálních lékových forem obsahuje nejvýše 0,05 % benzaldehydu a nejvýše 0,1 % jiných příbuzných látek.

Halogenové sloučeniny a halogeny.

Všechno používané laboratorní sklo musí být prosté chloridů. Připraví se namočením do roztoku kyseliny dusičné R (500 g/l) přes noc, opláchnutím vodou R a uchováváním ve vodě R. Doporučuje se vyčlenit laboratorní sklo pro tuto zkoušku.

Roztok (a). 6,7 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 7,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,125 g *niklu Raneyova R*. Směs se zahřívá 10 min na vodní lázni a ochladí se při pokojové teplotě. Pak se zfiltruje do 25ml odměrné

baňky, třikrát se promyje 2 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml. Tento roztok se použije při přípravě roztoku A.
Roztok (b). Stejným způsobem se připraví roztok bez zkoušené látky. Tento roztok se použije na přípravu roztoku B.

Do čtyř 25ml odměrných baněk se převede odděleně 10 ml roztoku (a), 10 ml roztoku (b), 10 ml základního *roztoku chloridů (8 μg Cl/ml)* (použije se k přípravě roztoku C) a 10 ml *vody R*. Do každé baňky se přidá 5 ml *síranu amonno-železitého RS5*, promíchá se a pak se po kapkách za míchání přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 5 ml *thiokyanatanu rtuťnatého RS*. Po protřepání se obsah každé baňky doplní *vodou R* na 25,0 ml a baňky se umístí na 15 min do vodní lázně 20 °C teplé. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 460 nm roztoku A za použití roztoku B jako kontrolní tekutiny a absorbance roztoku C za použití roztoku připraveného s 10 ml *vody R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance roztoku A není větší než absorbance roztoku C (300 μg/g).

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5.

Zbytek po odpaření. 2,0 g se odpaří do sucha na vodní lázni, odparek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C a nechá se zchladnout v exsikátoru. Zbytek váží nejvýše 1 mg (0,05 %).

Stanovení obsahu

K 0,900 g (m g) se přidá 15,0 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů *acetanhydridu R* a *pyridinu R* (1 + 7) a nechá se vařit 30 min pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 25 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* (n_1 ml) za použití 0,25 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška (n_2 ml).

Obsah C_7H_8O v procentech se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{10{,}81\ (n_2 - n_1)}{m}.$$

Uchovávání

Ve zcela naplněných dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních lékových forem.

Alcohol cetylicus

Cetylalkohol

Synonymum. Alcoholum cetylicum

CAS 36653-82-4

Je to směs tuhých alkoholů obsahující hlavně 1-hexadekanol (CH_3-$(CH_2)_{14}$-CH_2OH; M_r 242,44).

Vlastnosti

Bílá mastná hmota, prášek, vločky nebo granule. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno až mírně rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru. Roztavený se mísí s rostlinnými a živočišnými oleji, s tekutým parafinem a s roztaveným tukem z ovčí vlny.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 46 °C až 52 °C.

B. Číslo hydroxylové *(2.5.3)*. 218 až 238.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve vroucím *lihu 96% R*, nechá se vychladnout a zředí se jím na 20 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6 *(2.2.2, Metoda II)*.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky rozpuštěné v 25 ml *chloroformu R*.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Alcohol cetylstearylicus

Cetylstearylalkohol

Synonyma. Alcoholum cetylstearylicum, Alcohol cetylicus et stearylicus

CAS 8005-44-5

Je to směs tuhých alifatických alkoholů. Obsahuje nejméně 40,0 % stearylalkoholu ($C_{18}H_{38}O$; M_r 270,50) a celkový obsah cetylalkoholu ($C_{16}H_{34}O$; M_r 242,44) a stearylalkoholu je nejméně 90,0 %.

Vlastnosti

Bílá až slabě nažloutlá voskovitá hmota ve tvaru vloček, šupinek nebo granulí. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v etheru, dobře rozpustný v lihu 90% (*V/V*) a v etheru petrolejovém; po roztavení je mísitelný s mastnými oleji, s tekutým parafinem a s roztaveným tukem z ovčí vlny.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční časy dvou hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku se shodují s retenčními časy hlavních píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí ve 20 ml vroucího *lihu 96% R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Teplota tání *(2.2.14)*. 49 °C až 56 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. 208 až 228.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky rozpuštěné v 25 ml *chloroformu R*.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 60,0 mg *cetylalkoholu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 40,0 mg *stearylalkoholu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) a 1 ml porovnávacího roztoku (b) se smíchají a zředí se *ethanolem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 3 m a vnitřního průměru 4 mm naplněná *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 30 ml/min jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 200 °C, teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 250 °C.

Nastříkne se odděleně po 2 µl každého roztoku. Průtoková rychlost se nastaví tak, aby rozlišení mezi dvěma hlavními píky na chromatogramu zkoušeného roztoku bylo nejméně 1,25. Zkoušku lze hodnotit, jestliže poměr signálu dvou hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) k šumu je nejméně 5. Obsah cetylalkoholu a stearylalkoholu se stanoví za použití chromatogramu zkoušeného roztoku metodou vnitřní normalizace z plochy píků, jejichž totožnost byla prokázána porovnáním s píky na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Alcohol cetylstearylicus emulsificans A

Emulgující cetylstearylalkohol (typ A)

Synonymum. Alcohol cetylicus et stearylicus emulsificans A

Je to směs, která obsahuje nejméně 90,0 % cetylstearylalkoholu a nejméně 7,0 % cetylstearylsíranu sodného, oba počítány na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílá nebo světle žlutá voskovitá hmota, plátky, vločky nebo granule. Je rozpustný v horké vodě za vzniku opalizujícího roztoku, prakticky nerozpustný ve studené vodě a těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 10 ml *trimethylpentanu R*. Protřepe se s 2 ml *lihu R* 70% (*V/V*) a oddělí se. Spodní vrstva se použije jako zkoušený roztok (b). 1 ml horní vrstvy se zředí *trimethylpentanem R* na 8 ml.
Zkoušený roztok (b). Použije se spodní vrstva získaná při přípravě zkoušeného roztoku (a).
Porovnávací roztok (a). 40 mg *cetylstearylalkoholu R* se rozpustí v 10 ml *trimethylpentanu R*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *cetylstearylsíranu sodného R* se zahřátím na vodní lázni rozpustí v 10 ml *lihu R* 70% (*V/V*).

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, acetonu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 12 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (50 g/l) v *lihu 96% R* a 15 min se zahřívá při 120 °C. Dvě hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou a barvou shodují s hlavními skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Dvě skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a barvou shodují s hlavními skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční časy dvou hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shodují s retenčními časy dvou hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Barví žlutě nesvítivý plamen.

D. K 0,3 g se přidá 20 ml *ethanolu R* a za protřepávání se zahřívá na vodní lázni. Směs se ihned zfiltruje, filtrát se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 7 ml *vody R*. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml roztoku *modři methylenové R* (1 g/l), 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 2 ml *dichlormethanu R* a protřepe se; vzniká modré zbarvení dichlormethanové vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 3,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky rozpuštěné ve 25 ml *chloroformu R*.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Cetylstearylalkohol. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 0,60 g *heptadekanolu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 150 ml.

Zkoušený roztok (a). 0,300 g se rozpustí v 50 ml roztoku vnitřního standardu, přidá se 50 ml *vody R* a čtyřikrát se vytřepává s 25 ml *pentanu R*. V případě potřeby se přidá *chlorid sodný R* k usnadnění oddělení vrstev. Spojené organické vrstvy se dvakrát promyjí 30 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Zkoušený roztok (b). 0,300 g se rozpustí v 50 ml *ethanolu R*, přidá se 50 ml *vody R* a čtyřikrát se vytřepává se 25 ml *pentanu R*. V případě potřeby se přidá *chlorid sodný R* k usnadnění oddělení vrstev. Spojené organické vrstvy se dvakrát promyjí 30 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Porovnávací roztok. 50 mg *cetylalkoholu CRL* a 50 mg *stearylalkoholu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony z křemenného skla 25 m dlouhé a vnitřního průměru 0,25 mm, jejíž vnitřní povrch je pokryt vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- dělicího poměru 1 : 100.

Teplota kolony se v době nástřiku udržuje na 150 °C, poté se zvyšuje rychlostí 5 °C/min do 250 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C. Látky jsou eluovány v pořadí: cetylalkohol, heptadekanol (vnitřní standard) a stearylalkohol.

Odděleně se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku (a) a 1 μl zkoušeného roztoku (b). Jestliže chromatogram zkoušeného roztoku (b) vykazuje pík se stejným retenčním časem jako pík odpovídající vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), vypočítá se poměr (r) podle vzorce:

$$r = \frac{S_{ci}}{S_i},$$

v němž značí:

S_{ci} - plochu píku odpovídajícího cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (b),

S_i - plochu píku se stejným retenčním časem, jako má pík odpovídající vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Jestliže r je menší než 300, vypočítá se korigovaná plocha $S_{Ha(kor)}$ píku odpovídajícího vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) podle vzorce:

$$S_{\mathrm{Ha(kor)}} = S'_{\mathrm{Ha}} - \frac{S_{\mathrm{i}} \cdot S_{\mathrm{c}}}{S_{\mathrm{ci}}},$$

v němž značí:

S'_{Ha} - plochu píku odpovídajícího vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

S_{c} - plochu píku odpovídajícího cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Za stejných podmínek se nastříknou odděleně stejné objemy porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku (a). Určí se totožnost píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) porovnáním jejich retenčních časů s píky na chromatogramu porovnávacího roztoku a stanoví se plocha každého píku.

Obsah cetylalkoholu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$S_{\mathrm{A}} \cdot \frac{100 \cdot m_{\mathrm{H}}}{S_{\mathrm{Ha(kor)}} \cdot m},$$

v němž značí:

S_{A} - plochu píku odpovídajícího cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

$S_{\mathrm{Ha(kor)}}$ - korigovanou plochu píku odpovídajícího vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

m_{H} - hmotnost vnitřního standardu ve zkoušeném roztoku (a) v miligramech,

m - hmotnost zkoušené látky ve zkoušeném roztoku (a) v miligramech.

Obsah stearylalkoholu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$S_{\mathrm{B}} \cdot \frac{100 \cdot m_{\mathrm{H}}}{S_{\mathrm{Ha(kor)}} \cdot m}$$

v němž značí:

S_{B} - plochu píku odpovídajícího stearylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Obsah cetylstearylalkoholu v procentech odpovídá součtu procentuálního obsahu cetylalkoholu a stearylalkoholu.

Cetylstearylsíran sodný. Asi 0,300 g se disperguje ve 25 ml *chloroformu R*, přidá se 50 ml *vody R* a 10 ml *dimidiumbromidu s modří sulfanovou RS*. Titruje se *benzetoniumchloridem 0,004 mol/l VS* za silného protřepávání. Před každým přidáním odměrného roztoku se nechají vrstvy oddělit a titruje se do změny zbarvení chloroformové vrstvy z růžové na šedomodrou.

1 ml *benzetoniumchloridu 0,004 mol/l VS* odpovídá 1,434 mg cetylstearylsíranu sodného.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Alcohol cetylstearylicus emulsificans B

Emulgující cetylstearylalkohol (typ B)

Synonymum. Alcohol cetylicus et stearylicus emulsificans B

Je to směs, která obsahuje nejméně 90,0 % cetylstearylalkoholu a nejméně 7,0 % laurylsíranu sodného, oba počítány na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílá nebo světle žlutá voskovitá hmota, plátky, vločky nebo granule. Je rozpustný v horké vodě za vzniku opalizujícího roztoku, je prakticky nerozpustný ve studené vodě a těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 10 ml *trimethylpentanu R*. Protřepe se s 2 ml *lihu R* 70% (*V/V*) a oddělí se. Spodní vrstva se použije jako zkoušený roztok (b). 1 ml horní vrstvy se zředí *trimethylpentanem R* na 8 ml.
Zkoušený roztok (b). Použije se spodní vrstva získaná při přípravě zkoušeného roztoku (a).
Porovnávací roztok (a). 40 mg *cetylstearylalkoholu R* se rozpustí v 10 ml *trimethylpentanu R*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *laurylsíranu sodného R* se zahřátím na vodní lázni rozpustí v 10 ml *lihu R* 70% (*V/V*).

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, acetonu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 12 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (50 g/l) v *lihu 96% R* a 15 min se zahřívá při 120 °C. Dvě hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou a barvou shodují s hlavními skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Jedna ze skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a barvou shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční časy dvou hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shodují s retenčními časy dvou hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Barví žlutě nesvítivý plamen.

D. K 0,3 g se přidá 20 ml *ethanolu R* a za protřepávání se zahřívá na vodní lázni. Směs se ihned zfiltruje, filtrát se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 7 ml *vody R*. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml roztoku *modři methylenové R* (1 g/l), 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 2 ml *dichlormethanu R* a protřepe se; vzniká modré zbarvení dichlormethanové vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 3,0; stanoví se s 2,00 g rozpuštěnými v 25 ml *chloroformu R*.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Cetylstearylalkohol. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 0,60 g *heptadekanolu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 150 ml.

Zkoušený roztok (a). 0,300 g se rozpustí v 50 ml roztoku vnitřního standardu, přidá se 50 ml *vody R* a čtyřikrát se vytřepává s 25 ml *pentanu R*. V případě potřeby se přidá *chlorid sodný R* k usnadnění oddělení vrstev. Spojené organické vrstvy se dvakrát promyjí 30 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Zkoušený roztok (b). 0,300 g se rozpustí v 50 ml *ethanolu R*, přidá se 50 ml *vody R* a čtyřikrát se vytřepává s 25 ml *pentanu R*. V případě potřeby se přidá *chlorid sodný R* k usnadnění oddělení vrstev. Spojené organické vrstvy se dvakrát promyjí 30 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Porovnávací roztok. 50 mg *cetylalkoholu CRL* a 50 mg *stearylalkoholu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony z křemenného skla 25 m dlouhé a vnitřního průměru 0,25 mm s vnitřním povrchem pokrytým vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- dělicího poměru 1 : 100.

Teplota kolony se v době nástřiku udržuje na 150 °C, poté se zvyšuje rychlostí 5 °C/min do 250 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C. Látky jsou eluovány v pořadí: cetylalkohol, heptadekanol (vnitřní standard) a stearylalkohol.

Odděleně se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku (a) a 1 μl zkoušeného roztoku (b). Jestliže chromatogram zkoušeného roztoku (b) vykazuje pík se stejným retenčním časem jako pík odpovídající vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), vypočítá se poměr (r) podle vzorce:

$$r = \frac{S_{ci}}{S_i},$$

v němž značí:

S_{ci} - plochu píku odpovídajícího cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (b),

S_i - plochu píku se stejným retenčním časem jako má pík odpovídající vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Jestliže *r* je menší než 300, vypočítá se korigovaná plocha $S_{Ha(kor)}$ píku odpovídajícího vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) podle vzorce:

$$S_{Ha(kor)} = S'_{Ha} - \frac{S_i \cdot S_c}{S_{ci}},$$

v němž značí:

S'_{Ha} - plochu píku odpovídajícího vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

S_c - plochu píku odpovídajícího cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Za stejných podmínek se nastříknou odděleně stejné objemy porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku (a). Určí se totožnost píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) porovnáním jejich referenčních časů s píky na chromatogramu porovnávacího roztoku a stanoví se plocha každého píku.

Obsah cetylalkoholu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$S_A \cdot \frac{100 \cdot m_H}{S_{Ha(kor)} \cdot m},$$

v němž značí:

S_A - plochu píku odpovídajícího cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

$S_{Ha(kor)}$ - korigovanou plochu píku odpovídajícího vnitřnímu standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

m_H - hmotnost vnitřního standardu ve zkoušeném roztoku (a) v miligramech,

m - hmotnost zkoušené látky ve zkoušeném roztoku (a) v miligramech.

Obsah stearylalkoholu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$S_B \cdot \frac{100 \cdot m_H}{S_{Ha(kor)} \cdot m},$$

v němž značí:

S_B - plochu píku odpovídajícího stearylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Obsah cetylstearylalkoholu v procentech odpovídá součtu procentuálního obsahu cetylalkoholu a stearylalkoholu.

Laurylsíran sodný. Asi 0,300 g se disperguje ve 25 ml *chloroformu R*, přidá se 50 ml *vody R* a 10 ml *dimidiumbromidu s modří sulfanovou RS*. Titruje se *benzetoniumchloridem 0,004 mol/l VS* za silného protřepávání. Před každým přidáním odměrného roztoku se nechají vrstvy oddělit a titruje se do změny zbarvení chloroformové vrstvy z růžové na šedomodrou.

1 ml *benzetoniumchloridu 0,004 mol/l VS* odpovídá 1,154 mg laurylsíranu sodného.

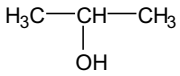
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Alcohol isopropylicus

Isopropylalkohol

Synonymum. Alcoholum isopropylicum



C_3H_8O M_r 60,10 CAS 67-63-0

Je to 2-propanol.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá tekutina. Je mísitelný s vodou, s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

A. Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,785 až 0,789.

B. Index lomu *(2.2.6)*. 1,376 až 1,379.

C. K 1 ml se přidají 2 ml *dichromanu draselného RS* a 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a směs se vaří. Vyvíjející se páry změní zabarvení kousku filtračního papíru navlhčeného *nitrobenzaldehydem RS* do zelena. Filtrační papír se zvlhčí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*; zabarvení se změní na modré.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a bezbarvá *(2.2.2, Metoda II)*. 1 ml se zředí *vodou R* na 20 ml. Po 5 min je roztok čirý *(2.2.1)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 25 ml se 5 min mírně vaří. Přidá se 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a nechá se ochladit na vzduchu, za chránění před oxidem uhličitým. Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru na světle růžové se spotřebuje nejvýše 0,6 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Benzen a příbuzné látky. Nejvýše 2 μg/g benzenu; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok (a). Zkoušená látka.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml *2-butanolu R1* se zředí zkoušeným roztokem (a) na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušeným roztokem (a) na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml *2-butanolu R1* a 0,5 ml *1-propanolu R* se zředí zkoušeným roztokem (a) na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušeným roztokem (a) na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,10 ml *benzenu R* se zředí zkoušeným roztokem (a) na 100,0 ml. 0,2 ml tohoto roztoku se zředí zkoušeným roztokem (a) na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro chromatografii R* (136 μm až 173 μm), impregnovanou 15 % *makrogolu 400 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C, teplota nástřikového prostoru na 150 °C a teplota detektoru na 200 °C.

Nastříkne se po 2 μl každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se ověří, že neobsahuje žádný pík se stejným retenčním časem, jako má pík 2-butanolu (relativní retenční čas vztaženo k 1-propanolu je 1,5) na chromatogramu zkoušeného roztoku (b).

Nastaví se citlivost systému tak, aby výšky píků odpovídajících 2-butanolu a 1-propanolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení píku 2-butanolu a 1-propanolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) není menší než 1,2.

Plocha píku odpovídajícího benzenu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není větší než rozdíl mezi plochou píku odpovídajícího benzenu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) a plochou píku odpovídajícího benzenu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) součet ploch píků, kromě hlavního píku a píku 2-butanolu, není větší než 3násobek plochy píku odpovídajícího 2-butanolu (0,3 %).

Peroxidy. Do 12ml zkumavky se zabroušenou zátkou o průměru asi 15 mm se převede 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS* a doplní se zcela zkoušenou látkou. Intenzivně se třepe a nechá se 30 min stát za chránění před světlem; nevznikne žádné zabarvení.

Netěkavé látky. *Zkouška se provede až po ověření, že zkoušená látka vyhovuje zkoušce Peroxidy.* 100 g se odpaří do sucha na vodní lázni a suší se v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 2 mg (20 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %, stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

A. aceton,
B. benzen,
C. diisopropylether,
D. diethylether,

E. methanol,
F. propanol.

Alcohol stearylicus

Stearylalkohol

Synonymum. Alcoholum stearylicum

CAS 112-92-5

Je to směs pevných alkoholů. Obsahuje nejméně 95,0 % oktadekanolu ($C_{18}H_{38}O$; M_r 270,50).

Vlastnosti

Bílé mastné šupinky, granulky nebo hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru. Po roztavení je mísitelný s mastnými oleji, tekutým parafinem a s roztaveným tukem z ovčí vlny.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas a velikost hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přibližně shodné s retenčním časem a velikostí hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí zahříváním k varu ve 20 ml *lihu 96% R* a nechá se zchladnout. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6 *(2.2.2, Metoda II)*.

Teplota tání *(2.2.14)*. 57 °C až 60 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. 197 až 217.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 2,0; stanoví se se 2,00 g zkoušené látky rozpuštěné, je-li třeba zahřátím, ve 25 ml *chloroformu R*.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,100 g *stearylalkoholu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *cetylalkoholu CRL* se rozpustí ve 4,5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *ethanolem R* na 5,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro chromatografii R* impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 220 °C, teplota nástřikového prostoru na 275 °C a detektoru na 250 °C.

Nastříknou se 2 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení píku odpovídajícího cetylalkoholu a píku odpovídajícího stearylalkoholu je nejméně 4,0.

Nastříkne se odděleně po 2 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Procentuální obsah oktadekanolu se vypočítá metodou vnitřní normalizace.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Alcoholes adipis lanae

Alkoholy tuku z ovčí vlny

Synonyma. Lanalcolum, Alcoholes lanae

CAS 8027-33-6

Je to čištěný nezmýdelnitelný podíl tuku z ovčí vlny (směs sterolů a vyšších alifatických alkoholů). Obsahuje nejméně 30,0 % cholesterolu. Jako stabilizační přísadu může obsahovat nejvýše 200 μg/g butylhydroxytoluenu.

Vlastnosti

Slabě nažloutlá až hnědavě žlutá hmota, lámavá, při zahřátí měknoucí. Jsou prakticky nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v dichlormethanu, v etheru a ve vroucím ethanolu, těžce rozpustné v lihu 90% (*V/V*).

Zkoušky totožnosti

50 mg se rozpustí v 5 ml *dichlormethanu R*, přidá se 1 ml *acetanhydridu R* a 0,1 ml *kyseliny sírové R*; v několika sekundách se zabarví zeleně.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. K 1,0 g se přidá 10 ml *etheru petrolejového R1* a zahřívá se na vodní lázni za protřepávání až do úplného rozpuštění. Po ochlazení je roztok čirý *(2.2.1)*.

Zásaditě reagující látky. 2,0 g se rozpustí v 25 ml horkého *lihu R* 90% *(V/V)* a přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS1*; nevznikne červené zbarvení.

Teplota tání *(2.2.15)*. Nejméně 58 °C. Zkoušená látka se roztaví zahřátím na vodní lázni při teplotě maximálně o 10 °C vyšší, než je očekávaná teplota tání; poté se vpraví do kapiláry a ponechá stát nejméně 16 h při teplotě 15 °C až 17 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2. Je-li třeba, zahřívá se zkoušená látka na vodní lázni pod zpětným chladičem do úplného rozpuštění.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. 120 až 180.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 15. Odeberou se kousky ve tvaru klínů, jejichž základna je tvořena povrchem zkoušené látky. Před stanovením se roztaví.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 12; 2,00 g se zahřívají 4 h pod zpětným chladičem.

Butylhydroxytoluen. Nejvýše 200 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *methyldekanoatu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,20 g *methyldekanoatu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí v *sirouhlíku R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,20 g *butylhydroxytoluenu R* se rozpustí v *sirouhlíku R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *sirouhlíkem R* na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *sirouhlíkem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*; před kolonu se umístí předkolona naplněná silanizovanou skelnou vatou,
- *dusíku pro plynovou chromatografii R* s průtokovou rychlostí 40 ml/min jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 180 °C, teplota detektoru na 300 °C. Nastříknou se zvolené objemy zkoušeného roztoku (a) a (b) a porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 2,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,1 %.

Emulgační schopnost. 0,6 g se v třecí misce roztaví na vodní lázni s 9,4 g *parafinu bílého měkkého R*. Po vychladnutí se do směsi po částech vmíchá 20 ml *vody R*; vznikne téměř bílá emulze podobná masti, z níž se během 24 h neoddělí žádná voda.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí v 12 ml horkého *lihu R* 90% (*V/V*), nechá se 18 h stát a potom se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16). Filtr se promyje dvakrát 15 ml *lihu R 90%* (*V/V*). Ke spojenému filtrátu s promývací tekutinou se přidá 20 ml čerstvě připraveného roztoku *digitoninu R* (10 g/l) v *lihu R* 90% (*V/V*) a zahřeje se na asi 60 °C. Po ochlazení se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16), sraženina se promyje 10 ml *lihu R* 90% (*V/V*) a usuší se do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C.

1 g zbytku odpovídá 0,239 g cholesterolu.

Uchovávání

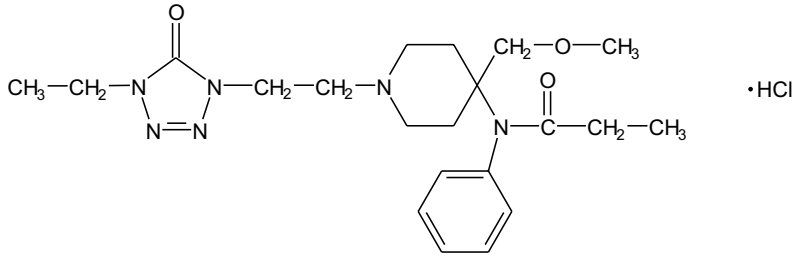
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede množství butylhydroxytoluenu, pokud byl přidán.

§§ Alfentanili hydrochloridum

Alfentaniliumchlorid



$C_{21}H_{33}ClN_6O_3$ M_r 452,98 CAS 69049-06-5

Je to N-{1-[2-(4-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazol-1-yl)ethyl]-4-(methoxymethyl)piperidin-4--yl}-N-propanamidmonohydrochlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{21}H_{33}ClN_6O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v methanolu.
Taje při teplotě asi 140 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. alfentaniliumchloridu.*

B. 50 mg zkoušené látky se rozpustí ve směsi 0,4 ml *amoniaku 17,5% RS* a 2 ml *vody R*, nechá se 5 min stát a zfiltruje se. Filtrát se okyselí *kyselinou dusičnou zředěnou RS*; vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). Pro přípravu *in situ* rozkladné sloučeniny (alfentanil nečistota E) se rozpustí 10 mg zkoušené látky v 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se 4 h na vodní lázni pod zpětným chladičem. Pak se zneutralizuje 10,0 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a odpaří na vodní lázni do sucha. Po ochlazení se zbytek rozpustí v 10 ml *methanolu R* a zfiltruje se.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min s následujícím gradientovým programem:
  - *mobilní fáze A* - roztok *uhličitanu amonného R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *tetrahydrofuranu R* a *vody R* (10 + 90),
  - *mobilní fáze B* - *acetonitril R,*

Čas (min)	Mobilní fáze A (% *V/V*)	Mobilní fáze B (% *V/V*)	Poznámka
0 až 15	90 → 40	10 → 60	lineární gradient
15 až 20	40	60	izokratická eluce
20 až 25	90	10	nastavení na původní podmínky
25 = 0	90	10	začátek dalšího gradientu

- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Kolona se promývá nejméně 30 min *acetonitrilem R* a pak nejméně 5 min mobilní fází o počátečním složení. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu získaném s 10 µl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Pokud jsou chromatogramy zaznamenávány za předepsaných podmínek, jsou retenční časy: alfentanilu nečistoty E asi 6 min, alfentaniliumchloridu asi 7 min. Nepřihlíží se k žádnému jinému píku.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími alfentaniliumchloridu a alfentanilu nečistotě E je nejméně 4,0. Pokud je to nutné, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo program lineárního gradientu.

Nastříkne se odděleně 10 µl *methanolu R* jako slepá zkouška, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Nepřihlíží se k žádnému píku získanému ve slepé zkoušce a k žádnému píku s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 4,0 %; provede se s 0,500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (4 + 1) a přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.* Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

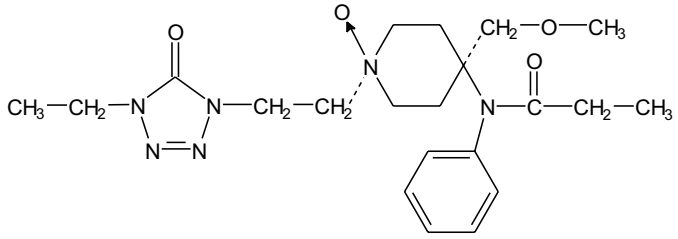
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 45,30 mg $C_{21}H_{33}ClN_6O_3$.

Uchovávání

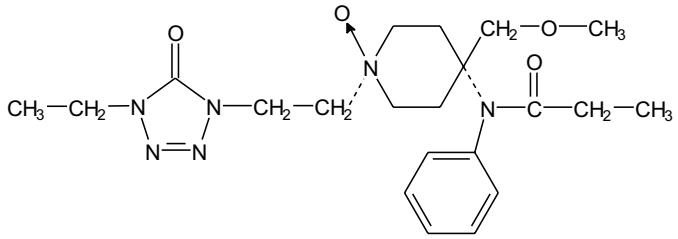
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Omamná látka.

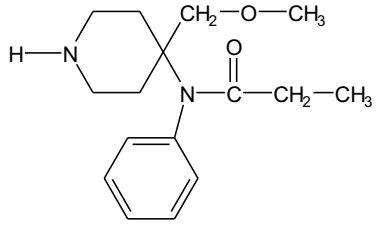
Nečistoty



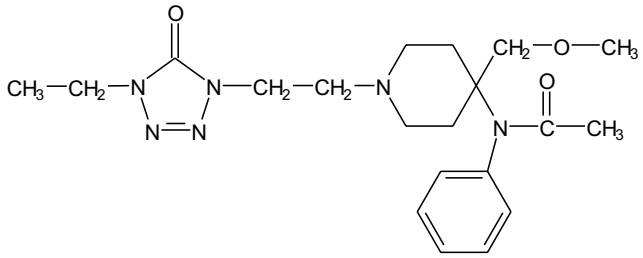
A. N-oxid *cis*-N-{1-[2-(4-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazol-1-yl)ethyl]-4-(methoxymethyl)piperidin-4-yl}-N-fenylpropanamidu,



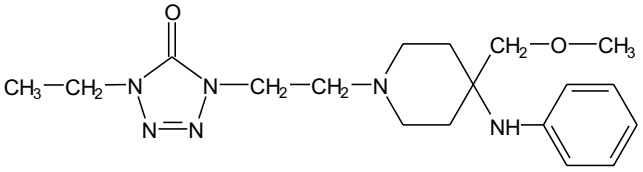
B. N-oxid *trans*-N-{1-[2-(4-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazol-1-yl)ethyl]-4-(methoxymethyl)-piperidin-4-yl}-N-fenylpropanamidu,



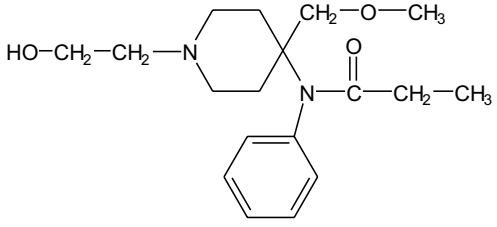
C. N-[4-(methoxymethyl)piperidin-4-yl]-N-fenylpropanamid,



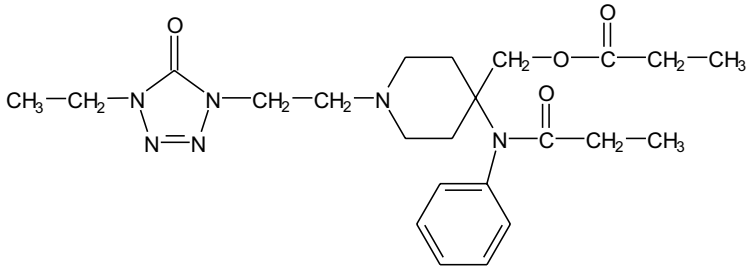
D. N-{1-[2-(4-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazol-1-yl)ethyl]-4-(methoxymethyl)piperidin-4-yl}-N--fenylacetamid,



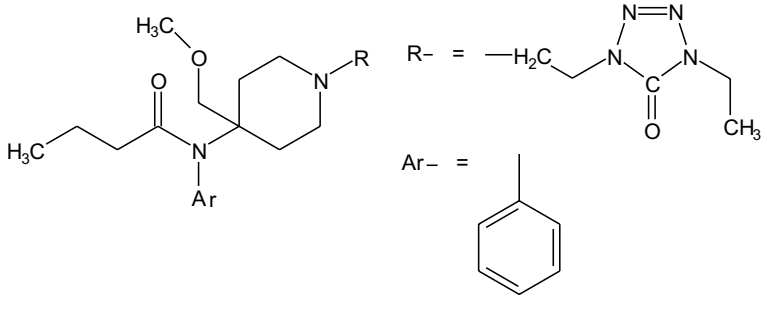
E. 1-ethyl-1,4-dihydro-4-{2-[4-(methoxymethyl)-4-fenylamino]piperidin-1-yl}ethyl-5*H*-tetrazol-5--on,



F. N-[1-(2-hydroxyethyl)-4-(methoxymethyl)piperidin-4-yl]-N-fenylpropanamid,



G. 1-[2-(4-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazol-1-yl)ethyl]-4-[(1-oxopropyl)fenylamino]-4-piperidinomethyl-propionat,



H. N-{1-[2-(4-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1*H*-tetrazol-1-yl)ethyl]-4-(methoxymethyl)piperidin-4-yl}-N--fenylbutanamid.

Algeldratum

Algeldrat

Synonyma. Aluminium hydroxydatum colloidale, Aluminii oxidum hydricum, koloidní hydroxid hlinitý

$Al(OH)_3 . nH_2O$ M_r bezvodého 78,00 CAS 1330-44-5 (hydrat.)

Je to hydratovaný oxid hlinitý. Obsahuje 47,0 % až 60,0 % sloučeniny Al_2O_3 (M_r 101,96).

Vlastnosti

Bílý amorfní prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na hliník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 7,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Alkalicky reagující látky. 1,0 g se třepe 1 min s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a pak se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; přidáním 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* růžové zbarvení nezmizí.

Neutralizační mohutnost. Zkouška se provede při 37 °C. 0,5 g se disperguje ve 100 ml *vody R*, zahřeje se, přidá se 100,0 ml předem zahřáté *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a nepřetržitě se míchá. pH *(2.2.3)* roztoku měřené po 10 min, 15 min a 20 min je nejméně 1,8, 2,3 a 3,0 a v žádném čase není vyšší než 4,5. Pak se přidá 10,0 ml předem zahřáté *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS*, 1 h se nepřetržitě míchá a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do pH 3,5. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* je nejvýše 35,0 ml.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,1 g se rozpustí zahřátím v 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (1 %).

Sírany *(2.4.13)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 100 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1 %).

Arsen *(2.4.2)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S se neutralizuje *amoniakem 26% R* za použití *žluti metanilové RS* jako vnějšího indikátoru. V případě potřeby se roztok zfiltruje a zředí se *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (60 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 10 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Enterobacteria* a určitých jiných gramnegativních bakterií a *Escherichia coli* (*2.6.13*).

Stanovení obsahu

0,800 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a po ochlazení se zředí *vodou R* na 50,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidává *amoniak zředěný RS1*, dokud nezačne vznikat sraženina. Pak se přidá *kyselina chlorovodíková zředěná RS* v nejmenším množství, které je třeba na rozpuštění sraženiny, a směs se zředí *vodou R* na 20 ml. Provede se chelatometrická titrace hliníku *(2.5.11)*.

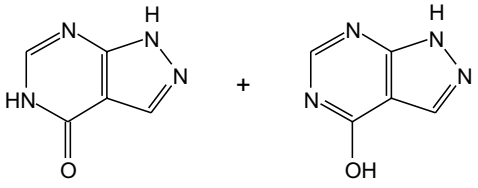
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,098 mg Al_2O_3.

Uchovávání

Ve vzduchtěsných obalech, při teplotě pod 30 °C.

† Allopurinolum

Alopurinol



$C_5H_4N_4O$ M_r 136,11 CAS 315-30-0

Je to 1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4(5*H*)-on a 1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-ol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_4N_4O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 mg se rozpustí v 1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 250 nm a absorpční minimum při 231 nm. Poměr absorbance naměřené v minimu při 231 nm k absorbanci naměřené v maximu při 250 nm je 0,52 až 0,62.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety připravené z asi 0,7 mg zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *alopurinolu CRL*.

C. 0,3 g se rozpustí ve 2,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a přidá se 50 ml *vody R*. Pomalu se přidává za stálého třepání 5 ml *dusičnanu stříbrného RS1*; vznikne bílá sraženina, která se po přidání 5 ml *amoniaku 17,5% RS* nerozpustí.

D. 50 mg se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidá se 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS*, povaří se a nechá se stát; vznikne žlutá vločkovitá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve 20 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ nebo $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *amoniaku 26% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 5 mg *5-aminopyrazol-4-karboxamidhydrogensulfatu CRL* se rozpustí v *amoniaku 26% R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methoxyethanolu R* a *2-butanonu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Po vysušení v proudu vzduchu se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skrvny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,120 g se rozpustí, je-li třeba opatrným zahřátím, v 50 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,61 mg $C_5H_4N_4O$.

Uchovávání

Separandum.

Aloe barbadensis

Aloe barbadoské

Je to zahuštěná a usušená šťáva z listů druhu *Aloe barbadensis* MILL. Obsahuje nejméně 28,0 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako aloin (barbaloin) ($C_{21}H_{22}O_9$; M_r 418,4), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Tmavě hnědá hmota, slabě lesklá nebo matná, lasturovitého lomu nebo hnědý prášek. Je částečně rozpustné ve vroucí vodě, za horka dobře rozpustné v lihu 96%, prakticky nerozpustné v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,25 g práškované drogy se smíchá s 20 ml *methanolu R* a zahřeje se ve vodní lázni k varu. Protřepává se několik minut a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

Porovnávací roztok. 25 mg *aloinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (13 + 17 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, pak se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části patrna žlutě fluoreskující skvrna (*aloin*) odpovídající svojí polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. V dolní části je patrna světle modře fluoreskující skvrna (*aloesin*). Vrstva se zahřívá 5 min při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je těsně pod skvrnou odpovídající aloinu patrna skvrna fluoreskující fialově.

B. 1 g práškované drogy se protřepává se 100 ml vroucí *vody R*. Po ochlazení se přidá 1 g *mastku R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g *tetraboritanu sodného R* a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smíchají s 20 ml *vody R*. Roztok fluoreskuje žlutozeleně. Fluorescence je zvlášť výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.

C. 5 ml roztoku ze Zkoušky totožnosti B se smíchá s 1 ml *bromové vody R*; vznikne hnědožlutá sraženina, supernatantní tekutina je zbarvena fialově.

Zkoušky na čistotu

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

0,300 g práškované drogy (180) se převede do kuželové baňky na 250 ml. Navlhčí se 2 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *vody R* asi 60 °C teplé a směs se promíchá. Pak se přidá dalších 75 ml *vody R* asi 60 °C teplé a 30 min se protřepává. Po ochlazení se zfiltruje do odměrné baňky. Kuželová baňka i filtr se promyjí 20 ml *vody R*. Promývací tekutina se přidá k filtrátu v odměrné baňce a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

10,0 ml tohoto roztoku se převede do baňky s kulatým dnem na 100 ml, přidá se 1 ml roztoku *chloridu železitého R* (600 g/l) a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se zahřívá 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu kapaliny v baňce. Po ochlazení se roztok převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml *vody R*, 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 4 ml *vody R*. Promývací tekutiny se přidají k roztoku v dělicí nálevce. Protřepává se třikrát 20 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se protřepou dvakrát

10 ml *vody R*. Spodní vrstva se odstraní, etherová vrstva se zředí *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Změří se absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 512 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se procentuální obsah hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako aloin ($C_{21}H_{22}O_9$), podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 19{,}6}{m} \ .$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 512 nm,
m - navážku drogy v gramech.

Hodnota specifické absorbance aloinu je 255.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněno před světlem.

Aloe capensis

Aloe kapské

Je to zahuštěná a usušená šťáva z listů některých druhů *Aloe*, zejména *Aloe ferox*. MILL. a jeho kříženců. Obsahuje nejméně 18,0 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako aloin (barbaloin) ($C_{21}H_{22}O_9$; M_r 418,4), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Tmavě hnědá hmota, nazelenalého lesku, lesklého lasturovitého lomu nebo zelenohnědý prášek. Je částečně rozpustné ve vroucí vodě, za horka dobře rozpustné v lihu 96%, prakticky nerozpustné v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu Aloe barbadoské.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části patrna žlutě fluoreskující skvrna (aloin), která svojí polohou odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. V dolní části chromatogramu jsou patrny dvě žlutě fluoreskující skvrny (aloinosid A a B) a skvrna fluoreskující modře (aloesin).

B. 1 g práškované drogy (180) se protřepává se 100 ml vroucí *vody R*. Po ochlazení se přidá 1 g *mastku R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g *tetraboritanu sodného R* a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smíchají s 20 ml *vody R*. Roztok fluoreskuje žlutozeleně, fluorescence je zvlášť výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.

C. 5 ml filtrátu ze Zkoušky totožnosti B se smíchá s 1 ml čerstvě připravené *bromové vody R*; vznikne žlutá sraženina, supernatantní tekutina není fialově zbarvena.

Zkoušky na čistotu

Aloe barbadoské. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,25 g práškované drogy se smíchá s 20 ml *methanolu R* a zahřeje se k varu ve vodní lázni. Protřepává se několik minut a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

Porovnávací roztok. 25 mg *aloinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (13 + 17 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, pak se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R*. Zahřívá se 5 min při 110 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není bezprostředně pod skvrnou odpovídající aloinu skvrna fluoreskující fialově.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

0,400 g práškované drogy (180) se převede do kuželové baňky na 250 ml. Navlhčí se 2 ml *methanolu R* a přidá se 5 ml *vody R* asi 60 °C teplé a důkladně se promíchá. Pak se přidá dalších 75 ml *vody R* asi 60 °C teplé a 30 min se protřepává. Po ochlazení se zfiltruje do odměrné baňky. Kuželová baňka a filtr se promyjí 20 ml *vody R*. Promývací tekutina se přidá k filtrátu v odměrné baňce a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do baňky s kulatým dnem na 100 ml, přidá se 1 ml roztoku *chloridu železitého R* (600 g/l) a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se zahřívá 4 h pod zpětným chladičem ve vodní lázni tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu kapaliny v baňce. Po ochlazení se roztok převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml *vody R*, 4 ml *hydroxidu sodného 1,0 mol/l RS* a 4 ml *vody R*. Promývací tekutiny se přidají k roztoku v dělicí nálevce. Protřepává se třikrát 20 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se protřepou dvakrát 10 ml *vody R*. Spodní vrstva se odstraní, etherová vrstva se zředí *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Změří se absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 512 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se procentuální obsah hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako aloin ($C_{21}H_{22}O_9$), podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 19{,}6}{m},$$

v němž značí:

A - absorbanci zkoušeného roztoku při 512 nm,

m - navážku drogy v gramech.

Hodnota specifická absorbance aloinu je 255.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněno před světlem.

Aloxiprinum

N

Aloxiprin

CAS 9014-67-9

Je to polymerní kondenzační produkt oxidu hlinitého a kyseliny acetylsalicylové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 7,5 % až 8,5 % hliníku (Al; A_r 26,98) a 79,0 % až 87,4 % celkových salicylanů, vyjádřeno jako kyselina acetylsalicylová $C_9H_8O_4$ (M_r 180,16).

Vlastnosti

Jemný bílý nebo slabě růžový prášek, bez pachu nebo téměř bez pachu. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96 % a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se vaří s 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, ochladí se a zfiltruje. Filtrát se použije pro zkoušku B. Zbytek na filtru se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a neutralizuje se *kyselinou octovou 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce a) na *salicylany (2.3.1*).

B. Filtrát ze zkoušky A vyhovuje zkoušce na *hliník (2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Asi 1,2 g (odpovídá 1,0 g celkových salicylanů) se třepe 30 min s 50 ml *etheru R* a rychle se zfiltruje přes skládaný papírový filtr. Filtrát se promyje několikrát *etherem R*, filtrát a promývací tekutina se spojí a zředí se *etherem R* na 100 ml.

Volná kyselina acetylsalicylová. Absorbance (*2.2.25*) roztoku S měřená v maximu při 278 nm je nejvýše 0,36 (0,5 %, vztaženo na celkový obsah salicylanů).

Kyselina salicylová. Absorbance *(2.2.25)* roztoku S měřená v maximu při 308 nm je nejvýše 0,50 (0,15 %, vztaženo na celkový obsah salicylanů).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). 2,0 g se opatrně spálí při nízké teplotě, ochladí se, přidají se 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R*, zahřívá se opatrně, dokud se vyvíjejí bílé dýmy, a potom se spaluje při 500 °C až 600 °C. Ochladí se, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* odpaří se do sucha na vodní lázni a dále se postupuje dle zkoušky C na těžké kovy počínaje "Zbytek se převede ...". K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml*).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

Hliník. 2,0 se spálí ve zváženém křemenném kelímku, opatrně se zahřívá, dokud není organická látka rozložena, a potom se žíhá při 1000 °C do konstantní hmotnosti.1g zbytku odpovídá 0,5292 g Al.

Celkové salicylany.

Zkoušený roztok. K 0,250 g se přidá 50 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a mírně se vaří do rozpuštění. Ochladí se, přidá se 50 ml *vody R*, upraví se pH na hodnotu 2,40 až 2,50 za použití *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 500 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidají 4 ml *chloridu železitého RS1*, nechá se 30 min stát a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok. Ke 4,0 ml roztoku *kyseliny salicylové R* (0,50 g/l) se přidají 4 ml *chloridu železitého RS1*, nechá se 30 min stát a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

Měří se absorbance (*2.2.25*) obou roztoků v maximu při 530 nm proti kontrolní tekutině připravené zředěním 4 ml *chloridu železitého RS1 vodou R* na 50 ml.

Z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků se vypočítá obsah celkových salicylanů, vyjádřeno jako kyselina acetylsalicylová ($C_9H_8O_4$).

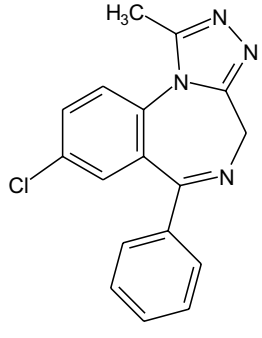
1 g kyseliny salicylové odpovídá 1,305 $C_9H_8O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

§ Alprazolamum

Alprazolam



$C_{17}H_{13}ClN_4$ M_r 308,77 CAS 28981-97-7

Je to 6-fenyl-8-chlor-1-methyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{13}ClN_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu a mírně rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkoušená látka se rozpustí v co nejmenším množství *ethylacetatu R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. 5,0 mg zkoušené látky se dobře smíchá s 5,0 mg *alprazolamu CRL*. Teplota tání *(2.2.14)* směsi se neliší od teploty tání zkoušené látky o více než 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *alprazolamu CRL*. Pokud se spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *ethylacetatu R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *alprazolamu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *alprazolamu CRL* a 10 mg *midazolamu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (2 + 15 + 20 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *alprazolamu CRL* a 2 mg *triazolamu CRL* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 100,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem fenylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 2 ml/min, při teplotě 40 °C a gradientu programovaného následujícím způsobem:
  - *mobilní fáze A* - směs objemových dílů tlumivého roztoku a *methanolu R* (44 + 56),
  - *mobilní fáze B* - směs objemových dílů tlumivého roztoku a *methanolu R* (5 + 95),
  - *tlumivý roztok* - 7,7 g *octanu amonného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R* a upraví se pH na hodnotu 4,2 pomocí *kyseliny octové ledové R,*

Čas (min)	Mobilní fáze A (% *V/V*)	Mobilní fáze B (% *V/V*)	Poznámka
0	98	2	izokraticky
15	98	2	lineární gradient
35	1	99	izokraticky
40	1	99	konec chromatografického záznamu, přepnout na počáteční podmínky
41	98	2	ustalování
50 = 0	98	2	konec ustalování

- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází o počátečním složení nejméně po dobu 30 min. Mezi jednotlivými chromatogramy se použijí podmínky popsané pro 40 min až 50 min. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Je-li chromatogram zaznamenáván za předepsaných podmínek, jsou retenční časy triazolamu asi 9 min a alprazolamu asi 10 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky alprazolamu a triazolamu je nejméně 1,5.

Nastříkne se odděleně 10 µl *dimethylformamidu R* jako slepá zkouška, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Nepřihlíží se k píkům získaným při slepé zkoušce a k píkům s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4 14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,140 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *acetanhydridu R* (3 + 2) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* do druhého inflexního bodu.

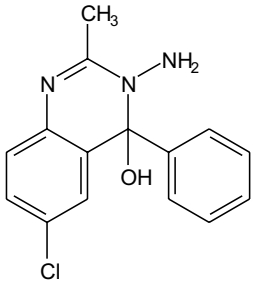
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,44 mg sloučeniny $C_{17}H_{13}ClN_4$.

Uchovávání

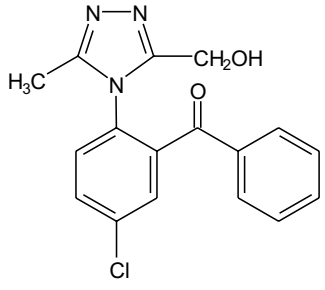
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

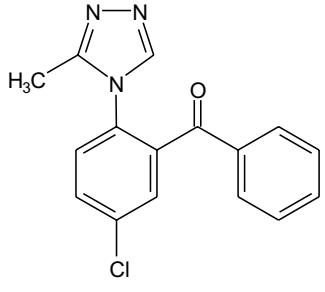
Nečistoty



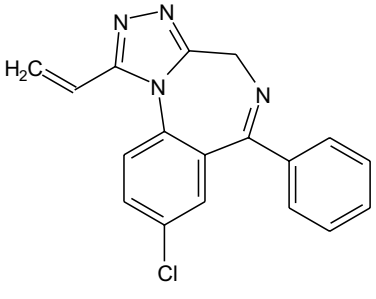
A. 3-amino-4-fenyl-6-chlor-2-methyl-3,4-dihydrochinazolin-4-ol,



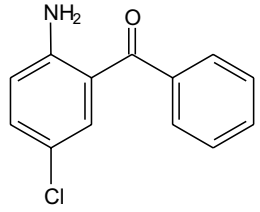
B. 5-chlor-2-(3-hydroxymethyl-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-4-yl)benzofenon,



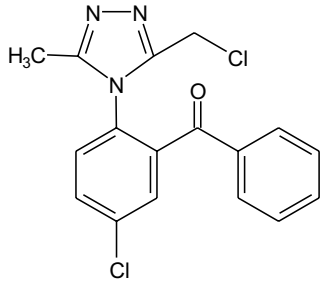
C. 5-chlor-2-(5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-4-yl)benzofenon,



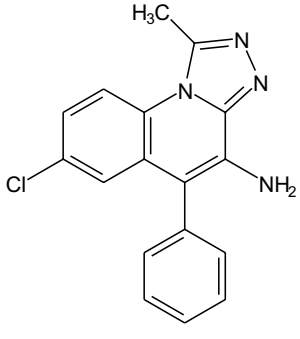
D. 6-fenyl-8-chlor-1-vinyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepin,



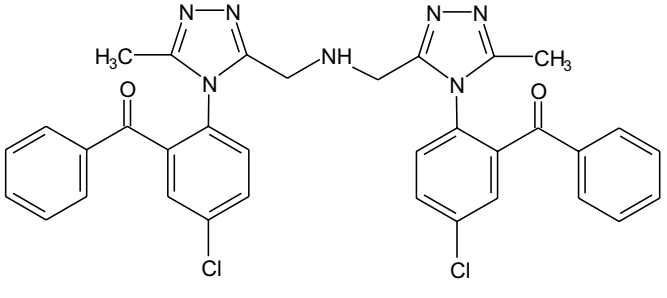
E. 2-amino-5-chlorbenzofenon,



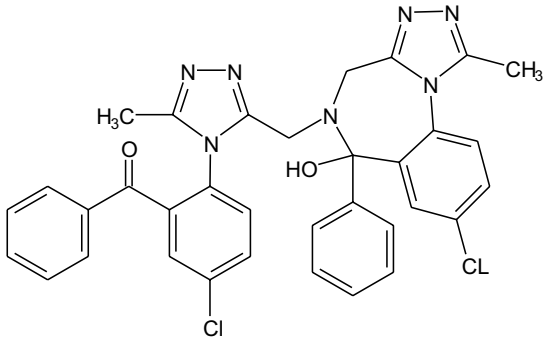
F. 5-chlor-2-(3-chlormethyl-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-4-yl)benzofenon,



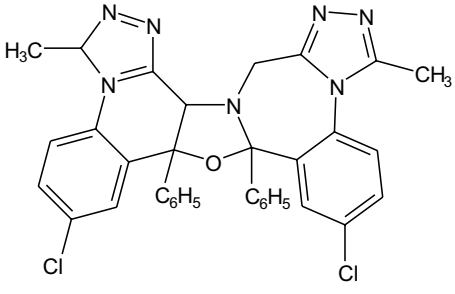
G. 5-fenyl-7-chlor-1-methyl-4*H*-[1,2,4]triazolo-[4,3-*a*]-4-chinolinylamin,



H. bis{[4-(2-benzoyl-4-chlorfenyl)-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl]methyl}amin,



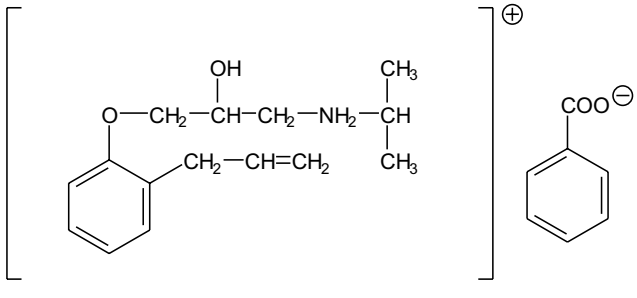
I. 5-{[4-(2-benzoyl-4-chlorfenyl)-5-methyl-4*H*-[1,2,4]triazol-3-yl]methyl}-6-fenyl-5,6-dihydro-8--chlor-1-methyl-4*H*-[1,2,4]-triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepin-6-ol,



J. kondenzovaný terciární aminodimer.

† Alprenololi benzoas

Alprenololiumbenzoat



$C_{22}H_{29}NO_4$ M_r 371,48

Je to (*RS*)-N-isopropyl-N-[3-(2-allylfenoxy)-2-hydroxy-1-propyl]amoniumbenzoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{29}NO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 116 °C až 120 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *alprenololiumbenzoatu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky A, viz Zkoušky na čistotu, v denním světle po vystavení parám jodu na dobu nejméně 2 h. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. 0,5 g se v nádobce pro sublimaci navlhčí 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, dno nádobky se opatrně zahřeje a bílý sublimát se zachytí na chladném místě nádobky. Sublimát (kyselina benzoová) taje *(2.2.14)* při 120 °C až 124 °C.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

1-(Isopropylamino)-3-[2-(1-propenyl)fenoxy]-2-propanol. 0,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* měřená při 297 nm není větší než 0,20 (0,1 %).

Příbuzné látky.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,60 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *alprenololiumbenzoatu CRL* a 10 mg *oxprenololiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 12 mg *alprenololiumbenzoatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.

Do komory obsahující vyvíjecí směs se nejméně 1 h před použitím umístí dvě nádoby, z nichž každá obsahuje 30 ml *amoniaku 26% R*. Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *ethylacetatu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se suší nejméně 3 h na vzduchu a potom se vystaví nejméně na 6 h parám jodu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) o R_F vyšším než hlavní skvrna odpovídající alprenololu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *alprenololiumbenzoatu CRL* a 4,0 mg *4-isopropylfenolu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 4,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min připravené takto: 0,45 g *oktansulfonanu sodného R* se rozpustí ve 150 ml *acetonitrilu R* a zředí se na 500 ml *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 2,8* (připraveným rozpuštěním 1,78 g *kyseliny fosforečné R* a 15,6 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* ve *vodě R* a zředěním na 2000 ml),
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází rychlostí 1 ml/min po dobu asi 1 h.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku byla asi 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek retenční časy látek jsou: kyseliny benzoové asi 4 min, alprenololu asi 10 min, 4-isopropylfenolu asi 16 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím alprenololu a píkem odpovídajícím 4-isopropylfenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 5. Je-li třeba, upraví se koncentrace oktansulfonanu sodného a nebo acetonitrilu v mobilní fázi (zvýšení koncentrace oktansulfonanu sodného zvýší retenční čas alprenololu a zvýšení koncentrace acetonitrilu sníží retenční čas obou sloučenin).

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (b) a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času alprenololu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě píku alprenololu a píku kyseliny benzoové, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %). K píku kyseliny benzoové a k píku s plochou menší než 0,1násobek plochy alprenololu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se nepřihlíží.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Míchat se musí důkladně a nepřetržitě, jinak se mohou získat nízké nebo nereprodukovatelné výsledky.

0,275 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,15 mg $C_{22}H_{29}NO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

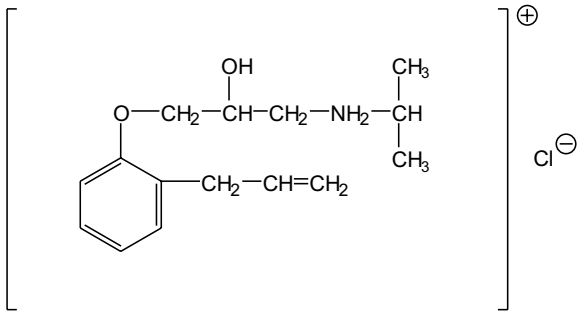
Separandum.

Nečistoty

A. 3-(2-allylfenoxy)-1,2-propandiol,
B. 2-allylfenol,
C. 1-(isopropylamino)-3-(2-propylfenoxy)-2-propanol,
D. N-isopropylamino-1,1′-bis[3-(2-allylfenoxy)-2-propanol],
E. 1-(isopropylamino)-3-[2-(1-propenyl)fenoxy]-2-propanol.

† Alprenololi hydrochloridum

Alprenololiumchloridum



$C_{15}H_{24}ClNO_2$ M_r 285,81 CAS 13707-88-5

Je to *(RS)*-N-isopropyl-N-{[3-(2-allylfenoxy)-2-hydroxy]propyl}amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{24}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 108 °C až 112 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *alprenololium-chloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky A, viz Zkoušky na čistotu, v denním světle po vystavení parám jodu na dobu 30 min. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_9 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je červený. Přidá se 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je žlutý.

1-(Isopropylamino)-3-[2-(1-propenyl)fenoxy]-2-propanol. 0,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml. Absorbance *(2.2.25)* měřená při 297 nm není větší než 0,20 (0,1 %).

Příbuzné látky.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *alprenololiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *alprenololiumchloridu CRL* a 10 mg *oxprenololiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.

Do vyvíjecí komory obsahující vyvíjecí směs se nejméně 1 h před použitím umístí dvě nádoby, z nichž každá obsahuje 30 ml *amoniaku 17,5% RS*. Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *ethylacetatu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C a potom se vystaví na 6 h parám jodu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) o R_F vyšším než hlavní skvrna není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 4,0 mg *alprenololiumchloridu CRL* a 0,8 mg *4-isopropylfenolu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 4,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min připravené takto: 0,656 g *oktansulfonanu sodného R* se rozpustí ve 150 ml *acetonitrilu R* a zředí se na 500 ml *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 2,8* (připraveného rozpuštěním 1,78 g *kyseliny fosforečné R* a 15,6 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* ve *vodě R* a zředěním na 2000 ml),
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází rychlostí 1 ml/min po dobu asi 1 h. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b) a citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Pokud se zaznamenají chromatogramy za výše uvedených podmínek, retenční časy látek jsou: alprenololiumchloridu asi 11 min, 4--isopropylfenolu asi 18 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím alprenololiumchloridu a píkem odpovídajícím 4-isopropylfenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 5. Je-li třeba, upraví se koncentrace oktansulfonanu sodného nebo acetonitrilu v mobilní fázi (zvýšení koncentrace oktansulfonanu sodného zvýší retenční čas alprenololiumchloridu a zvýšení koncentrace acetonitrilu sníží retenční čas obou látek).

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %). K píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se nepřihlíží.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 2,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve směsi 25 ml stejných objemových dílů *ethanolu R* a *vody R*. Přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,58 mg $C_{15}H_{24}ClNO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. 3-(2-allylfenoxy)-1,2-propandiol,
B. 2-allylfenol,
C. 1-isopropylamino-3-[2-(1-propenyl)fenoxy]-2-propanol,
D. N,N-bis[2-(2-allylfenoxy)-2-hydroxypropyl]isopropylamin.

Althaeae folium

N

Proskurníkový list

Synonymum. Folium althaeae

Je to usušený list druhu *Althaea officinalis* L.

Vlastnosti

Droga bez pachu, chuti mdle slizovité.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. List šedozelený, krátce řapíkatý, vejčitý až trojúhle srdčitý, třílaločný až pětilaločný, zubatý, na obou stranách hustě šedě hedvábitě plstnatý. Žilnatina dlanitá, na spodní straně silně vyniklá.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka listu na svrchní straně z buněk se stěnami mírně, na spodní straně se stěnami silně vlnitě zprohýbanými. Některé pokožkové buňky vyplněny slizem. Četné krycí hvězdovité chlupy tvoří dvě až osm jednobuněčných, na bázi tečkovaných ramen. Žlaznaté chlupy (typ Malvaceae) s jednobuněčnou nohou a jednobuněčnou až pětibuněčnou hlavičkou. Anizocytické průduchy (*2.8.3*) na obou stranách listu. List bifaciální. Palisádový parenchym nejvýše dvouřadý s malými intercelulárami, houbový parenchym třířadý až pětiřadý s velkými intercelulárami a se slizovými buňkami, jejichž stěny jsou výrazně ztlustlé. V mezofylu v blízkosti žilnatiny drúzy šťavelanu vápenatého. Kolaterální svazky cévní provázeny dvěma pruhy kolenchymu.

C. Práškovaná droga. Prášek je šedozelený. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky hvězdovitých chlupů s tečkovanou bází, úlomky pokožky a mezofylu s drúzami šťavelanu vápenatého, slizové buňky vzhledem k rozpustnosti slizu jsou jen těžce patrné.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 5,0 % jinak zbarvené drogy; nejvýše 10,0 % jiných částí matečné rostliny; nejvýše 3,0 % listů napadených rzí *Puccinia malvacearum* MONTAGNE; nejvýše 1,0 % cizích organických příměsí; nejvýše 0,5 % anorganických příměsí.

Práškovaná droga může jen v míře dané limitem obsahovat tečkované cévy, zdřevnatělá sklerenchymatická vlákna a velké parenchymatické buňky dřeně (lodyha) a krátce stopkaté, žlutohnědé, dvoubuněčné, podlouhle eliptické teleutospory se stěnami ztlustlými (*Puccinia malvacearum* MONTAGNE).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 16,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,5 %.

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 12; stanoví se s 0,200 g práškované drogy (355).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Althaeae radix

Proskurníkový kořen

Synonymum. Radix althaeae

Je to loupaný nebo neloupaný, celý nebo řezaný usušený kořen druhu *Althaea officinalis* L.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Neloupaná celá droga je tvořena válcovitými, mírně zkroucenými kořeny až 2 cm tlustými, hrubě podélně brázditými. Na povrchu je šedohnědá, s četnými jizvami po postranních kořenech. Lom je v obvodové části vláknitý, ve vnitřní části nepravidelně zrnitý. Úlomky kořene mají více nebo méně silnou vrstvu bělavé kůry, s nahnědlým peridermem; kůra je nahnědlým kambiem zřetelně oddělena od bíle zbarveného dřeva. Po navlhčení je zřetelný vrstevnatý vzhled kůry a paprsčitá struktura dřeva.

Loupaná droga je na povrchu šedobílá, jemně vláknitá. Korek a zevní vrstva parenchymu kůry chybí.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědavě šedý (neloupaný kořen) nebo bělavý (loupaný kořen). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky bezbarvých, převážně nezdřevnatělých, na konci špičatých nebo rozštěpených sklereid; úlomky schodovitě, tečkovitě nebo síťovitě ztlustlých cév; drúzy šťavelanu vápenatého o průměru 20 μm až 35 μm, většinou však 25 μm až 30 μm; buňky parenchymu obsahující sliz; u neloupaného kořene úlomky korku s tenkostěnnými, deskovitými buňkami. Pozoruje se pod mikroskopem ve *vodě R*. Prášek obsahuje četná škrobovitá zrna o průměru 3 μm až 25 μm, občas s podlouhlou trhlinou, většinou jednotlivá, někdy zhloučena po dvou až čtyřech.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Nejvýše 2 % zhnědlé drogy. U loupaného kořene nejvýše 2 % kořenů s vrstvou korku.

Číslo bobtnavosti *(2.8.4)*. Nejméně 10; stanoví se s práškovanou drogou (710).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (710) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 6,0 % (loupaný kořen). Nejvýše 8,0 % (neloupaný kořen).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Aluminii chloridum hexahydricum

Hexahydrát chloridu hlinitého

$AlCl_3 . 6H_2O$ M_r 241,43 CAS 7784-13-6

M_r bezvodého 133,34

Obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $AlCl_3 . 6H_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek nebo bezbarvé rozplývající se krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v glycerolu.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 ml roztoku S2, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 2 ml. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

B. 0,3 ml roztoku S2 se zředí *vodou R* na 2 ml. Roztok vyhovuje zkoušce na hliník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 10,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Roztok S2. 50 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S2 je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Alkalické kovy a kovy alkalických zemin. K 20 ml roztoku S2 se přidá 100 ml *vody R* a zahřeje se k varu. K horkému roztoku se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS*. Přidává se *amoniak zředěný RS1* do změny zbarvení indikátoru na žluté a zředí se *vodou R* na 150 ml. Potom se zahřeje k varu a zfiltruje se. 75 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a žíhá do konstantní hmotnosti; hmotnost zbytku váží nejvýše 2,5 mg (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 42,0 % až 48,0 %; stanoví se s 50,0 mg zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve 25,0 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace hliníku *(2.5.11)*. Titruje se *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* do změny šedozeleného zbarvení indikátoru na růžové. Provede se slepá zkouška.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,14 mg $AlCl_3 . 6H_2O$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Aluminii sulfas

Síran hlinitý

Synonymum. Aluminium sulfuricum

$Al_2(SO_4)_3 . nH_2O$ M_r bezvodého 342,14 CAS 10043-01-3 (bezvodý)
CAS 17927-65-0 (hydrát)

Je to síran hlinitý s proměnlivým obsahem krystalové vody. Obsahuje 51,0 % až 59,0 % $Al_2(SO_4)_3$.

Vlastnosti

Bezbarvé lesklé krystaly nebo krystalická hmota. Je dobře rozpustný ve studené vodě, snadno rozpustný v horké vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

B. Roztok S vyhovuje zkoušce na hliník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,5 až 4,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25 ml.

Alkalické kovy a kovy alkalických zemin. Ke 20 ml roztoku S se přidá 100 ml *vody R*, zahřeje se, přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a přidává se *amoniak zředěný RS1* do změny zbarvení indikátoru na žluté. Pak se směs zředí *vodou R* na 150 ml, zahřeje se k varu a zfiltruje se. 75 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a vyžíhá se. Zbytek váží nejvýše 2 mg (0,4 %).

Amonium *(2.4.1)*. 0,4 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 14 ml vyhovuje limitní zkoušce na amonium (500 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 6 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 2 ml roztoku S zředěné *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (100 μg/g). Při této zkoušce se použije 0,3 ml *kyseliny thioglykolové R*.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 20 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace hliníku *(2.5.11)*.
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,11 mg $Al_2(SO_4)_3$.

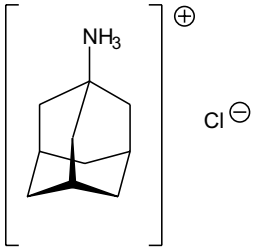
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Amantadini hydrochloridum

Amantadiniumchlorid

Synonymum. Amantadinium chloratum



$C_{10}H_{18}ClN$ M_r 187,71 CAS 665-66-7

Je to 1-tricyklo[3,3,1,1 ^{3,7}]decylamoniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{18}ClN$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Při zahřívání sublimuje.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *amantadiniumchloridu CRL.*

B. K 0,1 g se přidá 1 ml *pyridinu R* a 0,1 ml *acetanhydridu R* a směs se asi 10 s zahřívá k varu. Horký roztok se naleje do 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, ochladí se na 5 °C a zfiltruje. Sraženina se promyje *vodou R* a suší se 1 h ve vakuu při 60 °C. Její teplota tání *(2.2.14)* je 147 °C až 151 °C.

C. 0,2 g se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a přidá se 1 ml roztoku *dusitanu sodného R* (500 g/l); vznikne bílá sraženina.

D. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 2 ml roztoku S se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml, přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok se zbarví žlutě. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok se zbarví červeně.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidají se 2 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l) a 2 ml *chloroformu R* a 10 min se třepe. Chloroformová vrstva se oddělí, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné směsí připravenou následovně: 19,5 g *křemeliny silanizované pro plynovou chromatografii R* se smíchá s 60 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (3,3 g/l) v *methanolu R* a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a pomalé rotace směsi (nosič). 0,4 g *uhlovodíků s nízkým tlakem par (typ L) R* se rozpustí v 60 ml *toluenu R* (rozpouští se až 5 h). Tento roztok se přidá na nosič a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a pomalé rotace směsi,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se zvyšuje lineárně rychlostí 6 °C/min ze 100 °C na 200 °C. Teplota vstřikovacího prostoru se udržuje na 220 °C a teplota detektoru na 300 °C. Nastřikuje se 1 μl nebo zvolený objem zkoušeného roztoku. Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Součet ploch všech píků na chromatogramu, kromě píku odpovídajícího amantadinu, není větší než 1 % celkové plochy píků a žádný jednotlivý pík, kromě píku odpovídajícího amantadinu, není větší než 0,3 % celkové plochy píků. Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce (A) na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,77 mg $C_{10}H_{18}ClN$.

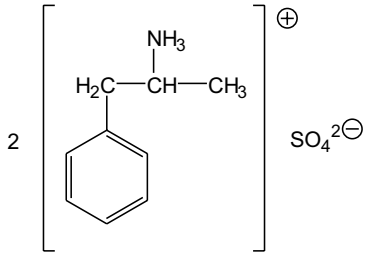
Uchovávání

Separandum.

§ Amfetamini sulfas

Amfetaminiumsulfat

Synonyma. Amphetamini sulfas, Amphetaminium sulfuricum



$C_{18}H_{28}N_2O_4S$ M_r 368,49 CAS 60-13-9

Je to bis[(*RS*)-(1-fenyl-2-propyl)amonium]sulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{18}H_{28}N_2O_4S$.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,04° až +0,04°; měří se roztok S, viz Zkoušky na čistotu, ve 2dm trubici.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* suspenze zkoušené látky v *parafinu tekutém R* se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. amfetaminiumsulfatu*.

C. K 50 ml roztoku S se přidá 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 0,5 ml *benzoylchloridu R*, protřepe se a postupně se přidává po 0,5 ml *benzoylchloridu R*, pokud vzniká sraženina. Sraženina se odfiltruje, promyje *vodou R*, rekrystalizuje se dvakrát ze směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (1 + 1) a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Krystaly tají *(2.2.14)* při 131 °C až 135 °C.

D. K asi 2 mg se přidá 1 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*; vznikne oranžové zbarvení, které se rychle změní na tmavě hnědé.

E. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 25 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,85 mg $C_{18}H_{28}N_2O_4S$.

Uchovávání

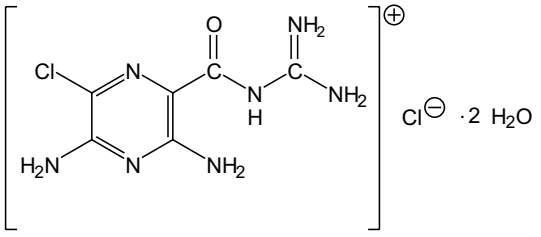
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

† Amiloridi hydrochloridum

Amiloridiumchlorid

Synonymum. Amiloridium chloratum



$C_6H_9Cl_2N_7O$. $2H_2O$ M_r 302,12 CAS 17440-83-4

M_r bezvodého 266,09

Je to dihydrát 1-(6-chlor-3,5-diamino-2-pyrazinkarbonyl)guanidiniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_9Cl_2N_7O$.

Vlastnosti

Světle žlutý až zelenožlutý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, D.

Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum zkoušené látky se shoduje se spektrem *amiloridiumchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 40 mg *amiloridiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R* a *dioxanu R* (6 + 6 + 88) po dráze 12 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je polohou, fluorescencí a velikostí shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 10 ml roztoku *cetrimidu R* (200 g/l), 0,25 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 1 ml *bromové vody RS*; vznikne zelenožluté zbarvení. Po přidání 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* se zbarvení změní na tmavě žluté a roztok v ultrafialovém světle při 365 nm modře fluoreskuje.

D. Vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Volné kyseliny. 1,0 g se rozpustí ve směsi 50 ml *methanolu R* a 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* není větší než 0,3 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 3) na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 3) na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *methylesteru kyseliny 3,5-diamino-6-chlorpyrin-2-karboxylové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze obsahující směs objemových dílů *tetramethylamoniumhydroxidu RS*, *acetonitrilu R* a *vody R* (5 + 250 + 745), jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 za použití směsi objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (1 + 9), o průtokové rychlosti 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (c) a upraví se koncentrace acetonitrilu tak, aby retenční čas *methylesteru kyseliny 3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-karboxylové CRL* byl 5 min až 6 min (zvýšení koncentrace acetonitrilu zkracuje retenční čas). Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a upraví se koncentrace tetramethylamoniumhydroxidu a kyseliny fosforečné pro udržení pH na hodnotě 7,0 tak, aby retenční čas amiloridu byl 9 min až 12 min (zvýšení koncentrace zkracuje tento retenční čas). Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b); zkoušku

lze hodnotit, jestliže poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) k šumu je nejméně 5,0.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (c) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 5násobku retenčního času píku amiloridu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě píku odpovídajícího amiloridu, není větší než plocha píku odpovídajícího methylesteru kyseliny 3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2--karboxylové na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 10 % plochy píku methylesteru kyseliny 3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-karboxylové) na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 11,0 % až 13,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí ve směsi 15 ml *dioxanu R* a 100 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,61 mg $C_6H_9Cl_2N_7O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

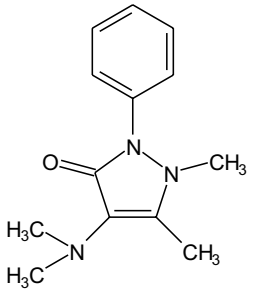
Separandum.

---

† Aminophenazonum

N

Aminofenazon



$C_{13}H_{17}N_3O$ M_r 231,30 CAS 58-15-1

Je to 4-dimethylamino-1-fenyl-2,3-dimethyl-5-pyrazolon. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{13}H_{17}N_3O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo drobné bezbarvé krystalky. Je dobře rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 107 °C až 109 °C.

B. K 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,2 ml *dusičnanu stříbrného RS2*; roztok se zbarví zprvu modrofialově a pak se vylučuje stříbro.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se jí zředí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.4)*. 7,5 až 9,0; měří se roztok S.

Snadno zuhelnitelné látky. 0,20 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové R*. Roztok je čirý a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$.

Fenazon. Ke 2 ml roztoku S se přidají 3 ml *vody R*, roztok 0,10 g *4-dimethylaminobenzaldehydu R* ve 3 ml *lihu 96% R*, 1 ml *kyseliny sírové R*, promíchá se a nechá stát 5 min. Roztok se nezbarví intenzivněji než současně připravený kontrolní roztok.

Chloridy *(2.4.4)*. 15,0 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (70 μg/g). Místo 1,0 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* se použije stejný objem *kyseliny sírové RS*.

Sírany *(2.4.13)*. 12,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,1 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny fialového zbarvení na modré. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,13 mg $C_{13}H_{17}N_3O$.

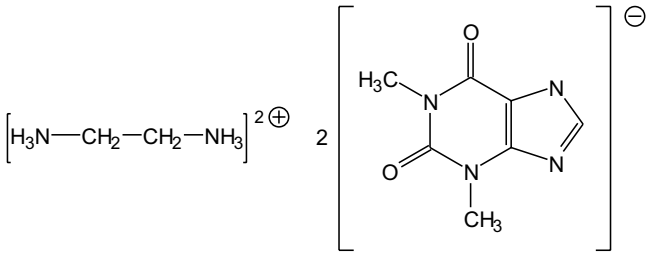
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Aminophyllinum

Aminofylin

Synonyma. Theophyllinum et ethylendiaminum, theofylin a ethylendiamin



$C_{16}H_{24}N_{10}O_4$ M_r 420,43 CAS 317-34-0

Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 84,0 % až 87,4 % theofylinu ($C_7H_8N_4O_2$; M_r 180,17) a 13,5 % až 15,0 % ethylendiaminu ($C_2H_8N_2$; M_r 60,10).

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý prášek nebo granule. Je snadno rozpustný ve vodě (roztok se kalí vlivem absorpce oxidu uhličitého), prakticky nerozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidají se po kapkách za protřepávání *2 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Sraženina se použije pro zkoušky totožnosti A, B, D a F a filtrát se použije pro zkoušku totožnosti C.

A. Sraženina promytá *vodou R* a vysušená při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 270 °C až 274 °C.

B. Sraženina promytá *vodou R* a vysušená při 100 °C až 105 °C se zkouší absorpční spektrofotometrií v infračervené oblasti *(2.2.24)*. Infračervené absorpční spektrum sraženiny se shoduje se spektrem *theofylinu CRL*.

C. K filtrátu se přidá 0,2 ml *benzoylchloridu R*, zalkalizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* a intenzivně se protřepe. Sraženina se odfiltruje, promyje 10 ml *vody R*, rozpustí v 5 ml horkého *lihu 96% R* a přidá se 5 ml *vody R*. Vyloučí se sraženina, která po promytí a vysušení při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 248 °C až 252 °C.

D. K asi 10 mg sraženiny se přidá 1,0 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (360 g/l), zahřívá se 3 min ve vodní lázni 90 °C teplé a přidá se 1 ml *kyseliny diazobenzensulfonové RS1*; pomalu vzniká červené zbarvení. Provede se slepá zkouška.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

F. Sraženina vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí zahřátím ve 2 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R, chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky rozpuštěné ve 20 ml *pyridinu bezvodého R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Ethylendiamin. 0,250 g se rozpustí ve 30 ml *vody R*. Přidá se 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,005 mg $C_2H_8N_2$.

Theofylin. 0,200 g se suší v sušárně při 135 °C do konstantní hmotnosti. Sušina se rozpustí zahřátím ve 100 ml *vody R*, ochladí se, přidá se 20 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a protřepe se. Přidá se 1 ml *modře bromthymolové RS1* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,02 mg $C_7H_8N_4O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Aminophyllinum hydricum

Hydratovaný aminofylin

Synonyma. Theophyllinum et ethylendiaminum hydricum, hydratovaný theofylin a ethylendiamin

CAS 5897-66-5

Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 84,0 % až 87,4 % theofylinu ($C_7H_8N_4O_2$; M_r 180,17) a 13,5 % až 15,0 % ethylendiaminu ($C_2H_8N_2$; M_r 60,10).

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý prášek nebo granule. Je snadno rozpustný ve vodě (roztok se kalí vlivem absorpce oxidu uhličitého), prakticky nerozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidají se po kapkách za protřepávání *2 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Sraženina se použije pro zkoušky totožnosti A, B, D a F a filtrát se použije pro zkoušku totožnosti C.

A. Sraženina promytá *vodou R* a vysušená při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 270 °C až 274 °C.

B. Sraženina promytá *vodou R* a vysušená při 100 °C až 105 °C se zkouší absorpční spektrofotometrií v infračervené oblasti *(2.2.24)*. Infračervené absorpční spektrum sraženiny se shoduje se spektrem *theofylinu CRL*.

C. K filtrátu se přidá 0,2 ml *benzoylchloridu R*, zalkalizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* a intenzivně se protřepe. Sraženina se odfiltruje, promyje 10 ml *vody R*, rozpustí v 5 ml horkého *lihu 96% R* a přidá se 5 ml *vody R*. Vyloučí se sraženina, která po promytí a vysušení při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 248 °C až 252 °C.

D. K asi 10 mg sraženiny se přidá 1,0 ml roztoku hydroxidu draselného R (360 g/l), zahřívá se 3 min ve vodní lázni 90 °C teplé a přidá se 1 ml *kyseliny diazobenzensulfonové RS1*; pomalu vzniká červené zbarvení. Provede se slepá zkouška.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

F. Sraženina vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí zahřátím ve 2 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R, chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 3,0 až 8,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky rozpuštěné ve 20 ml *pyridinu R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Ethylendiamin. 0,250 g se rozpustí ve 30 ml *vody R*. Přidá se 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,005 mg $C_2H_8N_2$.

Theofylin. 0,200 g se suší v sušárně při 135 °C do konstantní hmotnosti. Sušina se rozpustí zahřátím ve 100 ml *vody R*, ochladí se, přidá se 20 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a protřepe se. Přidá se 1 ml *modře bromthymolové RS1* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,02 mg $C_7H_8N_4O_2$.

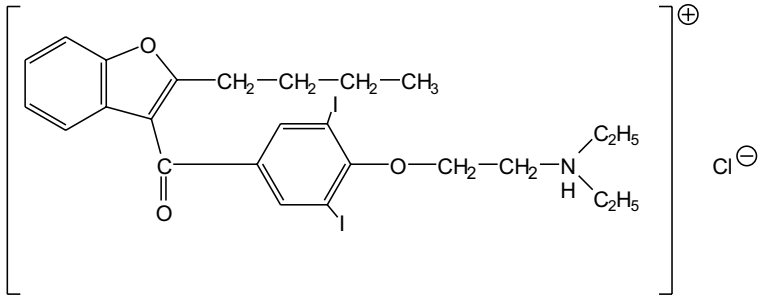
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Amiodaroni hydrochloridum

Amiodaroniumchlorid



$C_{25}H_{30}ClI_2NO_3$ M_r 681,78 CAS 19774-82-4

Je to N,N-diethyl-2-[4-(2-butyl-3-benzofuranylkarbonyl)-2,6-dijodfenoxy]ethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{25}H_{30}ClI_2NO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v hexanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 159 °C až 163 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *amiodaroniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,2 až 3,8; měří se roztok připravený takto: 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* zahřátím na 80 °C, ochladí se a zředí se stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R. Roztoky se připravují těsně před použitím, chráněny před přímým světlem.*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *amiodaroniumchloridu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *(2-chlorethyl)diethylamoniumchloridu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se suší proudem chladného vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %).

Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným RS1* a potom *peroxidem vodíku zředěným RS* a vrstva se ihned pozoruje v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného rozto-

ku (a) odpovídající (2-chlorethyl)diethylaminu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,2 %).

Jodidy. *Zkoušený roztok a porovnávací roztok se připraví současně.* 1,50 g se přidá ke 40 ml *vody R* teplé 80 °C a třepe se do úplného rozpuštění. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 50,0 ml (roztok a).

Zkoušený roztok. K 15,0 ml roztoku (a) se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, 1,0 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 20,0 ml. Potom se roztok nechá stát 4 h chráněn před světlem.

Porovnávací roztok. K 15,0 ml roztoku (a) se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, 1,0 ml roztoku *jodidu draselného R* (88,2 μg/g) a 1,0 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. Potom se roztok nechá 4 h stát chráněn před světlem.

Změří se absorbance *(2.2.25)* roztoků při 420 nm proti kontrolní tekutině, kterou je směs 15,0 ml roztoku (a) a 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* zředěná *vodou R* na 20,0 ml. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než polovina absorbance porovnávacího roztoku (150 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h při 50 °C a tlaku nepřesahujícím 0,3 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,600 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 75 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 68,18 mg $C_{25}H_{30}ClI_2NO_3$.

Uchovávání

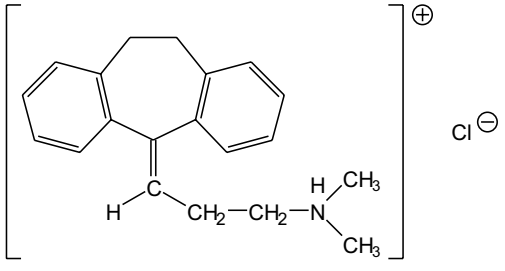
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Separandum.

† Amitriptylini hydrochloridum

Amitriptyliniumchlorid

Synonymum. Amitriptylinium chloratum



$C_{20}H_{24}ClN$ M_r 313,87 CAS 549-18-8

Je to N,N-dimethyl-N-{3-(10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyklohepten-5-yliden)propyl}--amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{24}ClN$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 195 °C až 199 °C.

B. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 239 nm. Specifická absorbance v maximu je 435 až 475.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. amitriptyliniumchloridu*.

D. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a přidají se 2 ml nasyceného roztoku *manganistanu draselného R*; fialové zbarvení roztoku rychle zmizí. Roztok se zahřeje na vodní lázni do téměř úplného rozpuštění hnědé sraženiny, pak se ochladí, vytřepe se 15 ml *etheru R*, aby se odstranil bílý zákal, a etherová vrstva se odstraní. K vodné vrstvě se přidá 5 ml *amoniaku 26% R*, třepe se 2 min, pak se přidají 3 ml *dichlormethanu R* a opět se protřepe; dichlormethanová vrstva se zbarví fialově červeně.

E. 50 mg vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,20 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, zředí se jí na 10 ml, přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je žlutý. Po přidání nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* je roztok červený.

Příbuzné látky. *Při zkoušce se roztoky a vyvíjející se chromatogramy chrání před přímým světlem.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *dibenzosuberonu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *cyklobenzapriniumchloridu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *ethylacetatu R* a *cyklohexanu R* (3 + 15 + 85) po dráze 14 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a rovnoměrně se postříká čerstvě připravenou směsí objemových dílů *formaldehydu R* a *kyseliny sírové R* (4 + 96), zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrny odpovídající dibenzosuberonu a cyklobenzapriniumchloridu nejsou intenzivnější než odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,05 %) a chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících dibenzosuberonu a cyklobenzapriniumchloridu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C pro těžké kovy (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 30 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,39 mg $C_{20}H_{24}ClN$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. dibenzosuberon (dibenzo[*a*,*d*]cykloheptanon),
B. cyklobenzaprin,
C. 3-(10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyklohepten-5-yliden)-N-methylpropylamin,
D. 5-[3-(dimethylamino)propyl]-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyklohepten-5-ol,
E. 1,2,3,4,4*a*,10,11,11*a*-oktahydro-3-(5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyklohepten-5-yliden)-N,N-dimethylpropylamin,
F. (*RS*)-5-[3-(dimethylamino)propyliden]-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyklohepten-10-ol.

Ammoniae solutio concentrata

Koncentrovaný roztok amoniaku

Obsahuje 25,0 % až 30,0 % amoniaku (NH_3; M_r 17,03).

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina, velmi žíravá. Je mísitelný s vodou a lihem 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,892 až 0,910.

B. Je silně alkalický *(2.2.4)*.

C. K 0,5 ml se přidá 5 ml *vody R*, roztokem se probublává vzduch a vzniklá směs plynů se vede na povrch roztoku obsahujícího 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a 0,05 ml *červeně methylové RS*; červené zbarvení roztoku se změní na žluté. Přidá se 1 ml *hexanitrokobaltitanu sodného RS*; vznikne žlutá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 220 ml se odpaří na vodní lázni téměř do sucha. Po ochlazení se přidá se 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 20 ml.

Vzhled roztoku. K 2 ml se přidá 8 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Oxidovatelné látky. Ke 100 ml *kyseliny sírové zředěné RS* se přidá opatrně za současného chlazení 8,8 ml zkoušené látky, přidá se 0,75 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS* a nechá se 5 min stát; roztok zůstane slabě růžový.

Pyridin a příbuzné látky. Změří se absorbance *(2.2.25)* při 252 nm proti *vodě R* jako kontrolní tekutině. Absorbance není větší než 0,06 (2 μg/ml, počítáno jako pyridin).

Uhličitany. K 10 ml ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 10 ml *hydroxidu vápenatého RS*, ihned se uzavře a promíchá se. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 10 ml roztoku *uhličitanu sodného bezvodého R* (0,1 g/l) (60 μg/ml).

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (1 μg/ml).

Sírany *(2.4.13)*. 3 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (5 μg/ml).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (1 μg/ml). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (0,25 μg/ml).

Zbytek po odpaření. 50 ml se odpaří na vodní lázni do sucha a 1 h se suší při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1 mg (0,02 g/l).

Stanovení obsahu

Odměrná baňka se zabroušenou zátkou obsahující 50,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* se zváží. Přidají se 2,0 ml zkoušené látky a opět se zváží. Potom se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do změny červeného zbarvení na žluté.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 17,03 mg NH_3.

Uchovávání

Chráněn před vzduchem, při teplotě nepřevyšující 20 °C.

Žíravina.

Ammonii chloridum

Chlorid amonný

Synonymum. Ammonium chloratum

NH_4Cl M_r 53,49 CAS 12125-02-9

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny NH_4Cl.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na chloridy *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce na amonné soli *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě destilované* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Bromidy a jodidy. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,05 ml *chloraminu T RS*. Po 1 min se přidají 2 ml *chloroformu R* a silně se protřepe; chloroformová vrstva zůstane bezbarvá *(2.2.2, Metoda I)*.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,00 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

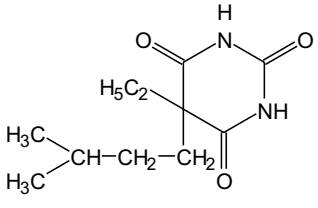
Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí v 20 ml *vody R*, přidá se 5 ml směsi *formaldehydu R* předem neutralizovaného na *fenolftalein RS* a 20 ml *vody R*. Po 1 min až 2 min se zvolna titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití dalších 0,2 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 53,49 mg NH_4Cl.

§ Amobarbitalum

Amobarbital



$C_{11}H_{18}N_2O_3$ M_r 226,27 CAS 57-43-2

Je to kyselina 5-ethyl-5-isopentylbarbiturová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{18}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustný v dichlormethanu. S alkalickými hydroxidy, uhličitany a s amoniakem tvoří ve vodě rozpustné soli.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Stanoví se teplota tání *(2.2.14)* zkoušené látky. Potom se smíchají stejné díly zkoušené látky a *amobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Rozdíl mezi stanovenými teplotami tání (má být asi 157 °C) není větší než 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *amobarbitalu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *amobarbitalu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se za použití spodní vrstvy směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 6 ml *vody R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 1,0 g se přidá 50 ml *vody R*, 2 min se vaří a po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS* a 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je žlutý. Přidá se 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je červený.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl obou roztoků a vyvíjí se za použití spodní vrstvy směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku. Potom se vrstva postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R*, usuší se na vzduchu, postříká se čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v li-hu RS* zředěným *lihem prostým aldehydů R* (1 v 5), zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a ihned se pozoruje. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí v 5 ml *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*. Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do jasně modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

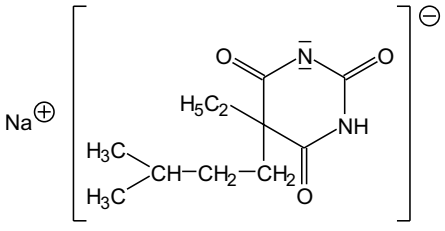
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,31 mg $C_{11}H_{18}N_2O_3$.

Uchovávání

Psychotropní látka.

§ Amobarbitalum natricum

Sodná sůl amobarbitalu



$C_{11}H_{17}N_2NaO_3$ M_r 248,26 CAS 64-43-7

Je to sodná sůl kyseliny 5-ethyl-5-isopentylbarbiturové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 102,0 % sloučeniny $C_{11}H_{17}N_2NaO_3$.

Vlastnosti

Bílý zrnitý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě prosté oxidu uhličitého (malá část může zůstat nerozpuštěna), snadno rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a protřepe se 20 ml *etheru R*. Etherová vrstva se oddělí, promyje se 10 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha, odparek se vysuší při 100 °C až 105 °C (odparek zkoušené látky). Tento postup se opakuje s 0,1 g *sodné soli amobarbitalu CRL* (odparek referenční látky). Stanoví se teplota tání *(2.2.14)* odparku zkoušené látky. Potom se smíchají stejné díly odparků zkoušené látky a referenční látky a stanoví se teplota tání této směsi. Rozdíl mezi stanovenými teplotami tání (má být asi 157 °C) není větší než 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* odparku zkoušené látky získaného ve zkoušce A se shoduje se spektrem odparku *sodné soli amobarbitalu CRL* získaného ve zkoušce A.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *sodné soli amobarbitalu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku *(2.3.1)*.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí v *lihu R* 50% (*V/V*) a zředí se jím na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. Nejvýše 11,0; měří se roztok připravený takto: 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml (malá část může zůstat nerozpuštěna).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl obou roztoků a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku. Potom se vrstva postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R*, vysuší se na vzduchu, postříká se čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem prostým aldehydů R* (1 v 5), zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a ihned se pozoruje. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrnám na startu.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 130 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 5 ml *ethanolu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*. Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do jasně modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,83 mg $C_{11}H_{17}N_2NaO_3$.

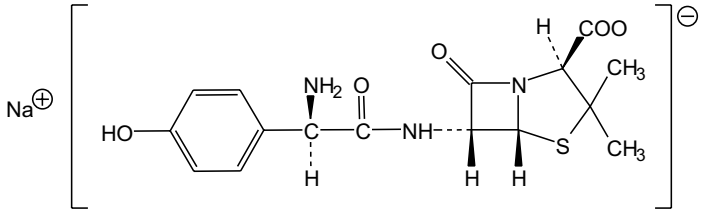
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Psychotropní látka.

† Amoxicillinum natricum

Sodná sůl amoxicilinu

1998



$C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$ M_r 387,39 CAS 34642-77-8

Je to sodná sůl kyseliny (6*R*)-6-[2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 85,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$.

Výroba

Jestliže se připravuje postupem, který zanechává zbytky kyseliny 2-ethylhexanové v produktu, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,8 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý velmi hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v lihu 96%, velmi těžce rozpustná v acetonu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli amoxicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg zkoušené látky se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (b). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* a 25 mg *trihydrátu ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se po dráze 15 cm směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 5,0 *kyselinou octovou ledovou R* (10 + 90). Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chroma-

togramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

D. Zkoušená látka vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Roztok ihned po rozpuštění neopalizuje více než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*. Roztok může vykazovat počáteční, ale přechodné růžové zbarvení. Po 5 min není absorbance (*2.2.25*) měřená při 430 nm vyšší než 0,20.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 8,0 až 10,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +240° až +290°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 62,5 mg v roztoku *hydrogenftalanu draselného R* (4 g/l) a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (d) a eluuje se izokraticky do eluce píku amoxicilinu. Nastříkne se 50 µl zkoušeného roztoku (b) a začne se izokratická eluce. Ihned po eluci píku amoxicilinu se použije následující lineární gradient. Jestliže složení mobilní fáze bylo upraveno k požadovanému rozlišení, použije se v čase 0 gradientové eluce upravené složení.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 - 25	92 → 0	8 → 100	lineární gradient
25 - 40	0	100	izokraticky
40 - 50	92	8	ustalování

Nastříkne se mobilní fáze A a použije se stejný eluční postup k provedení slepé zkoušky. Nastříkne se porovnávací roztok (e) a použije se stejný eluční postup. Tři nejdůležitější píky eluované po hlavním píku odpovídají amoxicilin-diketopiperazinu, dimeru amoxicilinu a trimeru amoxicilinu, vztaženo k hlavnímu píku, mají relativní retenční čas asi 3,4, 4,1 a 4,5. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) plocha žádného píku odpovídajícího dimeru amoxicilinu není větší než čtyřnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (4 %); plocha žádného píku, kromě plochy hlavního píku a žádného píku odpovídajícího dimeru amoxicilinu, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (2 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Chlorid sodný. Nejvýše 2,0 %, počítáno na bezvodou látku. 1,000 g se rozpustí v 50 ml *vody destilované R* a přidá se 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití indikační stříbrné elektrody a porovnávací merkurosulfatové nebo jiné vhodné elektrody.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,845 mg NaCl.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 0,400 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králika 1,0 ml roztoku ve *vodě na injekci R* obsahujícího 20 mg zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 30,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). Připraví se těsně před použitím. 30,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 30,0 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 4,0 mg *cefadroxilu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází A na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 2,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 20,0 ml.

Porovnávací roztok (e). K 0,20 g *trihydrátu amoxicilinu R* se přidá 1,0 ml *vody R*. Třepe se a přidává se po kapkách *hydroxid sodný zředěný RS* do vzniku roztoku. Hodnota pH roztoku je asi 8,5. Roztok se nechá 4 h stát při teplotě místnosti. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktedecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A* je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* 25% (*V/V*) (1 + 99) s upravenou hodnotou pH na 5,0 *hydroxidem sodným zředěným RS*,
  - *mobilní fáze B* je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* 25% (*V/V*) (20 + 80) s upravenou hodnotou pH na hodnotu 5,0 *hydroxidem sodným zředěným RS*,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se stabilizuje mobilní fází, v níž poměr fází A : B je 92 : 8. Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení na chromatogramu mezi píky odpovídajícími amoxicilinu a cefadroxilu je nejméně 2,0 (je-li třeba, upraví se poměr A : B mobilní fáze) a kapacitní poměr pro první pík (amoxicilin) je 1,3 až 2,5. Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (c). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl nejméně 3. Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a).

Procentuální obsah sodné soli amoxicilinu se vypočítá vynásobením procentuálního obsahu amoxicilinu číslem 1,060.

Uchovávání

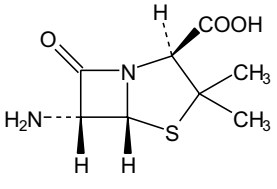
Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

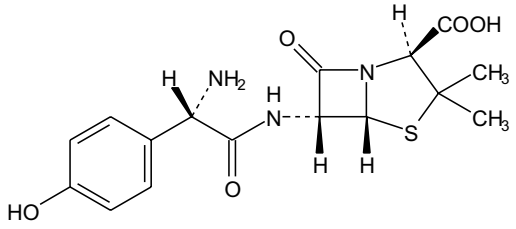
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

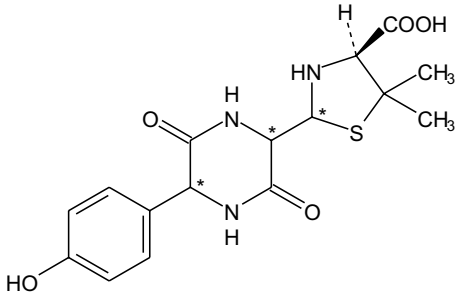
Nečistoty



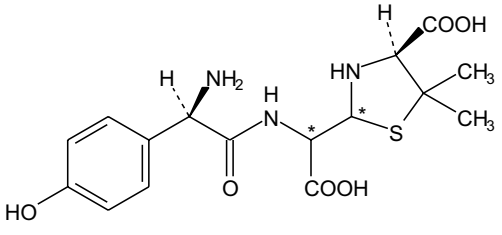
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



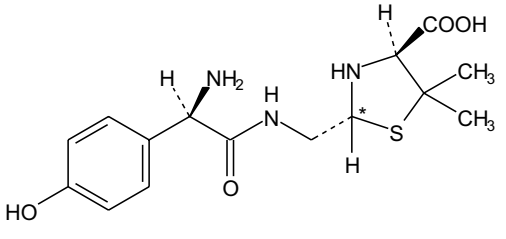
B. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*S*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1--azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (L-amoxicilin),



C. kyselina(4*S*)-2-[5-(4-hydroxyfenyl)-3,6-dioxopiperazin-2-yl]-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (diketopiperaziny amoxicilinu),

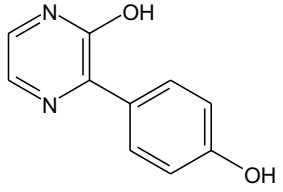


D. kyselina (4*S*)-2-{[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-karboxymethyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny amoxicilinu),

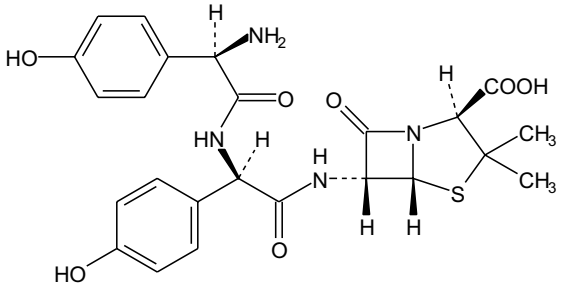


a epimer k C*

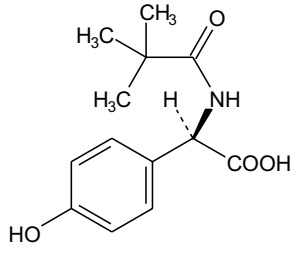
E. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny amoxicilinu),



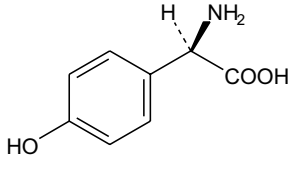
F. 3-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-ol,



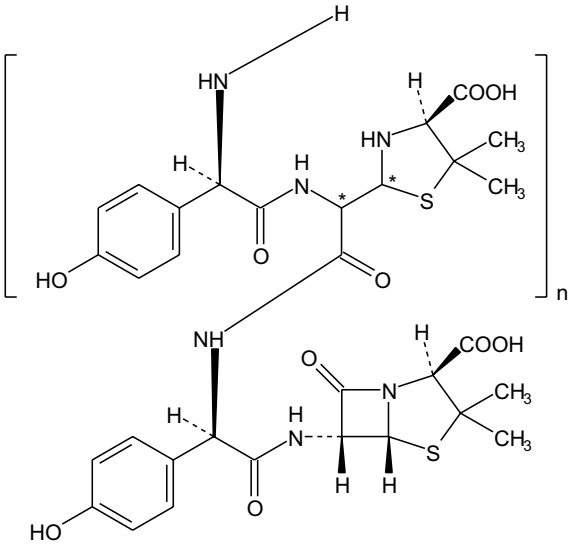
G. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-{(2*R*)-2-[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido}-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová [L-(4-hydroxyfenyl)glycylamoxicilin],



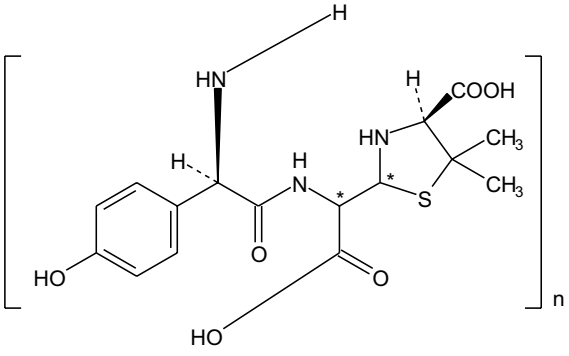
H. kyselina (2*R*)-2-(2,2-dimethylpropionamido)-2-(4-hydroxyfenyl)octová,



I. kyselina (2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)octová,



J. ko-oligomery amoxicilinu a penicilových kyselin amoxicilinu,



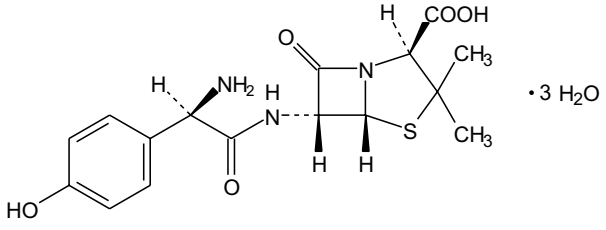
K. oligomery penicilových kyselin amoxicilinu.

† Amoxicillinum trihydricum

1998

Trihydrát amoxicilinu

Synonymum. Amoxicillinum



$C_{16}H_{19}N_3O_5S$. $3H_2O$ M_r 419,45 CAS 61336-70-7

M_r bezvodého 365,40

Je to trihydrát kyseliny (6*R*)-6-[2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{19}N_3O_5S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v mastných olejích. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *trihydrátu amoxicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (b). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* a 25 mg *trihydrátu ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl z každého roztoku a vyvíjí se po dráze 15 cm směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R* (10 + 90). Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se dají do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Pomocí ultrazvukové lázně nebo mírného zahřátí se 0,100 g rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS*. Odděleně se rozpustí 1,0 g v 10 ml *amoniaku zředěného RS2*. Roztoky ihned po rozpuštění neopalizují intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 5,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +290° až +315°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) s upraveným poměrem A : B mobilní fáze a tlumením, jak je popsáno u stanovení obsahu. Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastříkne se čerstvě připravený roztok zkoušené látky (b) a začne se izokratická eluce se zvolenou mobilní fází. Ihned po eluci píku amoxicilinu se začne lineární gradientová eluce k dosažení poměru mobilní fáze A : B 0 : 100 během 25 min. Pokračuje se s mobilní fází B po dobu 15 min, potom se kolona ustaluje po dobu 15 min původně zvolenou mobilní fází.

Nastříkne se mobilní fáze A a použije se stejná gradientová eluce k provedení slepé zkoušky. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) plocha žádného píku, kromě plochy hlavního píku a píků zaznamenaných na chromatogramu při slepé zkoušce, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 11,5 % až 14,5 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 30,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 30,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 30,0 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 4,0 mg *cefadroxilu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází A na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 2,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 20,0 ml.

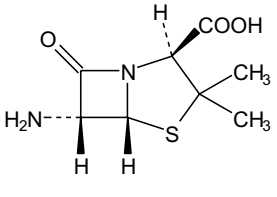
Chromatografický postup se obvykle provede za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A* je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a tlumivého roztoku o pH 5,0 (1 + 99),
  - *mobilní fáze B* je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a tlumivého roztoku o pH 5,0 (20 + 80),
  - příprava tlumivého roztoku: k 250 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* se přidává *hydroxid sodný zředěný RS* k dosažení hodnoty pH 5,0 a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 50 µl.

Kolona se ustaluje mobilní fází s poměrem fází A : B 92 : 8. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Zkoušku nelze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 2,0. V případě potřeby se upraví poměr A : B mobilní fáze. Kapacitní poměr pro první pík (amoxicilin) je 1,3 až 2,5. Nastříkne se porovnávací roztok (c). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl nejméně tři. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a).

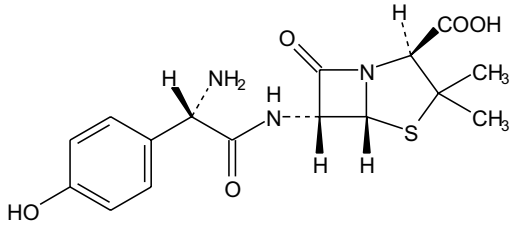
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

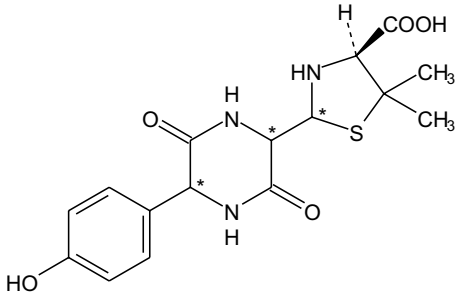
Nečistoty



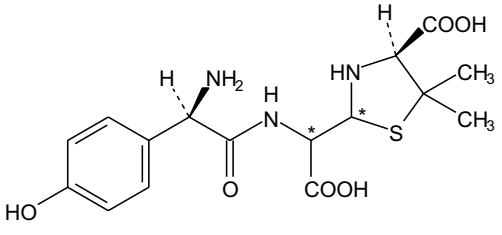
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



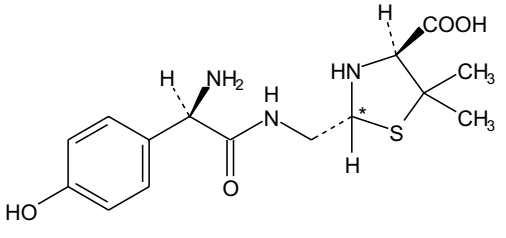
B. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*S*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1--azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (L-amoxicilin),



C. kyselina(4*S*)-2-[5-(4-hydroxyfenyl)-3,6-dioxopiperazin-2-yl]-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (diketopiperaziny amoxicilinu),

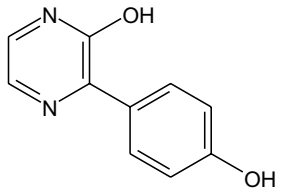


D. kyselina (4*S*)-2-{[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-karboxymethyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny amoxicilinu),

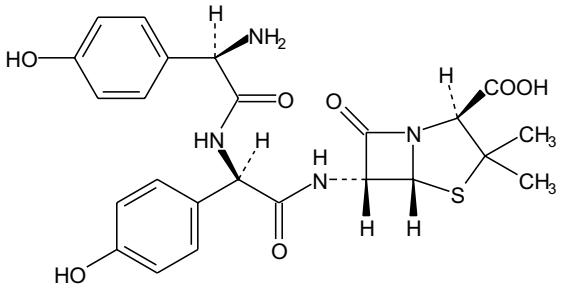


a epimer k C*

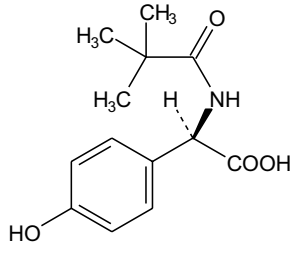
E. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny amoxicilinu),



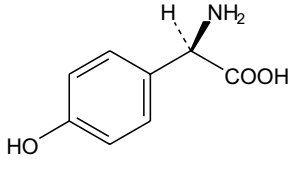
F. 3-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-ol,



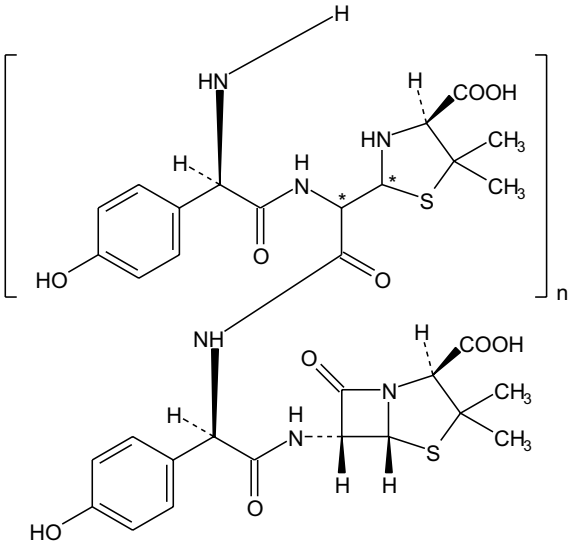
G. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-{(2*R*)-2-[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido}-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová [L-(4-hydroxyfenyl)glycylamoxicilin],



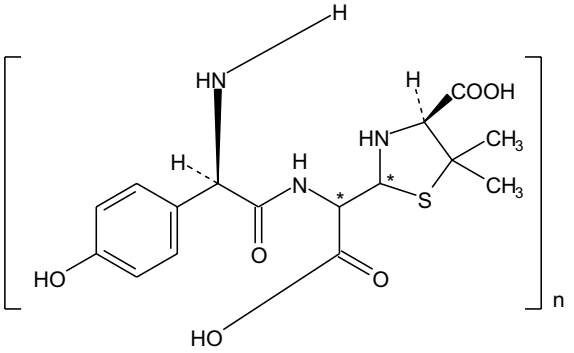
H. kyselina (2*R*)-2-(2,2-dimethylpropionamido)-2-(4-hydroxyfenyl)octová,



I. kyselina (2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)octová,



J. ko-oligomery amoxicilinu a penicilových kyselin amoxicilinu,

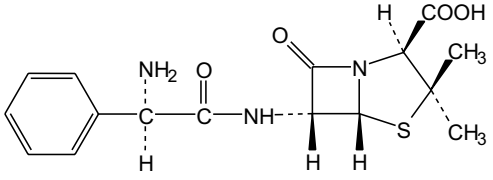


K. oligomery penicilových kyselin amoxicilinu.

† Ampicillinum

Ampicilin

Synonymum. Ampicillinum anhydricum



$C_{16}H_{19}N_3O_4S$ M_r 349,40 CAS 69-53-4

Je to kyselina (6*R*)-6-[2-amino-2-fenylacetamido)penicilanová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{19}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu, v lihu 96%, v etheru a v mastných olejích. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2.).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *ampicilinu CRL*. Měří se tablety látek připravené s *bromidem draselným R*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS*.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS*.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* a 25 mg *ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R*, (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem. Roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

D. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Odděleně se rozpustí 1,0 g v 10 ml *amoniaku zředěného RS2*. Roztoky ihned po rozpuštění neopalizují více než porovnávací suspenze II (*2.2.1*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 5,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 40 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +280° až +305°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 62,5 mg ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Nejvýše 1,0 %; stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu.

Nastříkne se porovnávací roztok (c) a izokraticky se eluuje. Nastříkne se čerstvě připravený zkoušený roztok (b) a izokraticky se začne eluovat. Ihned po eluci píku ampicilinu se použije následující lineární gradient. Jestliže složení mobilní fáze bylo upraveno k požadovanému rozlišení, použije se v čase 0 gradientové eluce upravené složení.

Čas (min)	Mobilní fáze A %(*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0	85	15
30	0	100
45	0	100

Kolona se ustaluje 15 min promýváním původní zvolenou fází. Nastříkne se mobilní fáze A a použije se stejná gradientová eluce k provedení slepé zkoušky.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) plocha žádného píku, kromě hlavního a píků pozorovaných při slepé zkoušce, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 27,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 27,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 27,0 mg *ampicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 5,0 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí mobilní fází A na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,25 m dlouhé a o vnitřním průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A* je směs 0,5 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 50 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a 50 ml *acetonitrilu R* zředěná *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* je směs 0,5 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 50 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a 400 ml *acetonitrilu* zředěná *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky 50 µl.

Kolona se stabilizuje mobilní fází, v níž poměr fází A : B je 85 : 15. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 3,0. Je-li třeba, upraví se poměr A : B mobilní fáze. Kapacitní poměr pro první pík (ampicilin) je 2,0 až 2,5. Nastříkne se porovnávací roztok (d). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl nejméně 3. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %.

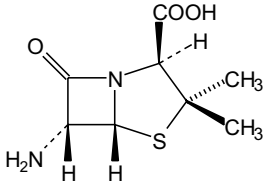
Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a). Vypočítá se procentuální obsah ampicilinu.

Uchovávání

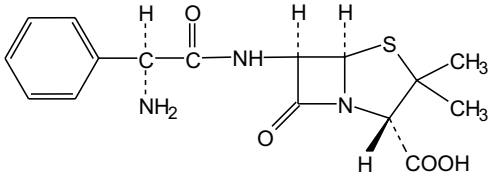
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Separandum.

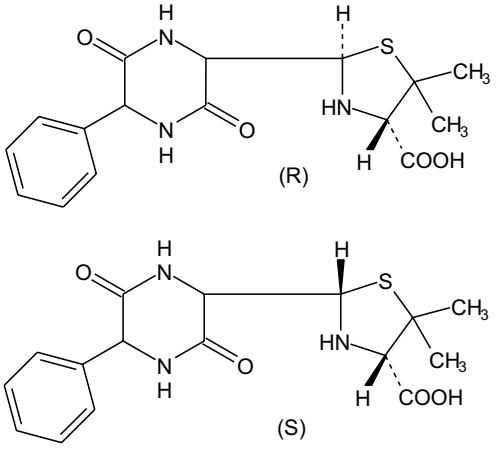
Nečistoty



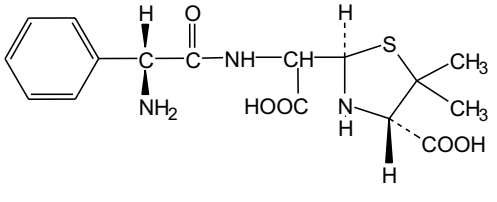
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



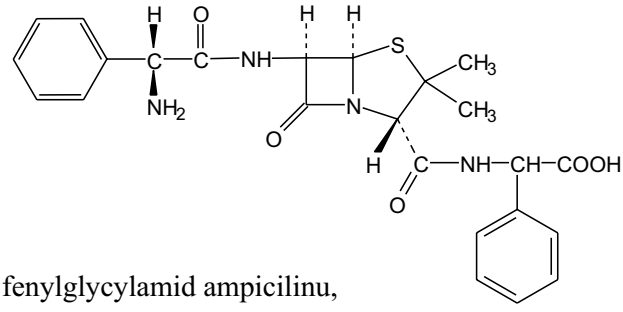
B. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(*S*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo-[3,2,0]heptan-2-karboxylová (L-ampicilin),



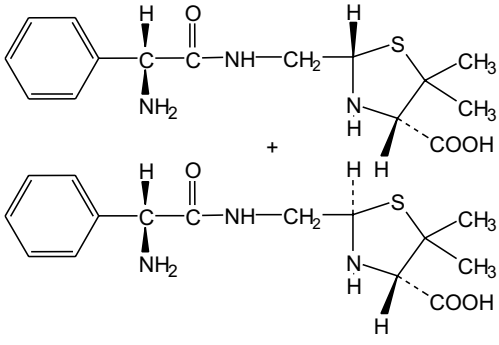
C. kyselina (*RS*)-5,5-dimethyl-2-(3,6-dioxo-5-fenylpiperazin-2-yl)thiazolidin-4-karboxylová,



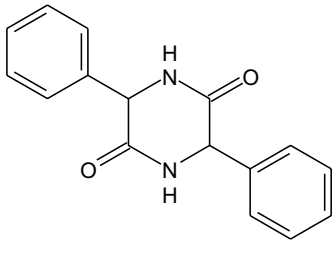
D. kyselina (2*R*,4*S*)-2-{(*RS*)-1-karboxy-1-[(*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny ampicilinu),



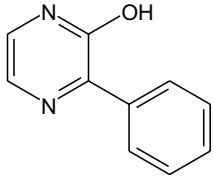
E. fenylglycylamid ampicilinu,



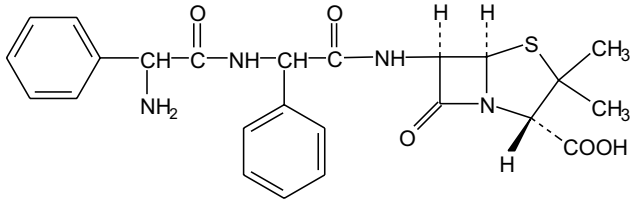
F. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-[(*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]methyl-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny ampicilinu),



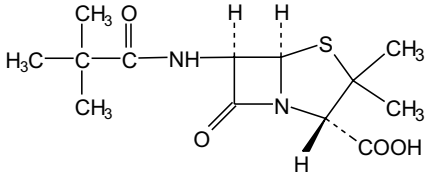
G. 3,6-difenylpiperazin-2,5-dion,



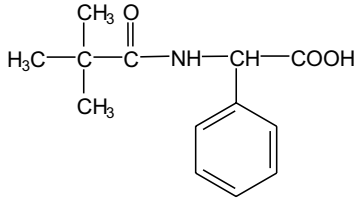
H. 3-fenylpyrazin-2-ol,



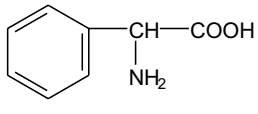
I. fenylglycylampicilin,



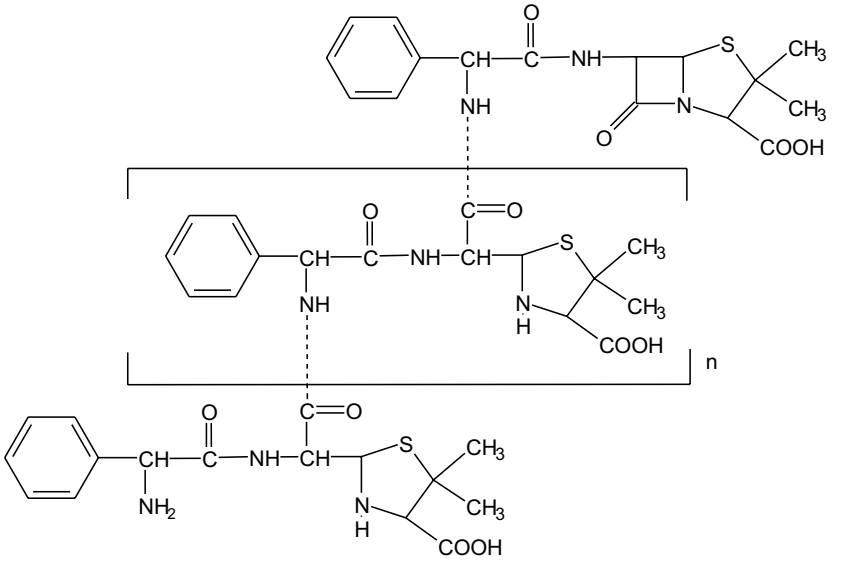
J. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-(2,2-dimethylpropanamido)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo-[3,2,0]heptan-2-karboxylová,



K. kyselina 2-(2,2-dimethylpropanamido)-2-fenyloctová,



L. 2-fenylglycin,

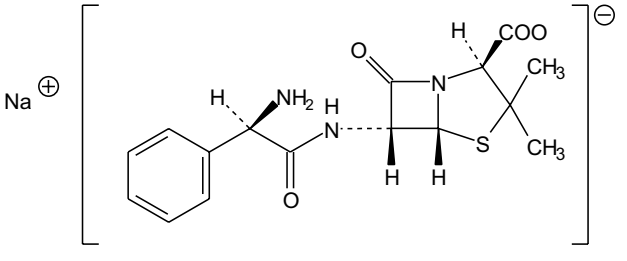


M. oligomery ampicilinu a penicilových kyselin ampicilinu.

† Ampicillinum natricum

Sodná sůl ampicilinu

1998



$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$ M_r 371,39 CAS 69-52-3

Je to sodná sůl kyseliny (6*R*)-6-[2-amino-2-fenylacetamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 92,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 91,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$.

Výroba

Jestliže je látka vyráběna postupem, který zanechává zbytky kyseliny 2-ethylhexanové v produktu, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýš 0,8 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v acetonu, prakticky nerozpustná v etheru, v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,250 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml *kyseliny octové zředěné R*, promíchá se krouživým otáčivým pohybem a nechá se stát 10 min v ledové vodě. Krystaly se filtrují malým filtrem ze slinutého skla (40) za použití sání, promyjí se 2 ml až 3 ml směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (1 + 9) a suší 30 min v sušárně při 60 °C. Krystaly se zkoušejí infračervenou absorpční spektrofotometrií (*2.2.24*). Absorpční spektrum zkoušené látky se shoduje se spektrem *trihydrátu ampicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *trihydrátu ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (b). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* a 25 mg *trihydrátu ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se umístí do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem. Roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

D. Zkoušená látka vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. K 1,0 g se v kuželové baňce přidá pomalu a za stálého míchání 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Odděleně se rozpustí 1,0 g ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Roztoky ihned po rozpuštění neopalizují intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) roztoku ve *vodě R* měřená při 430 nm není větší než 0,15.

Hodnota pH (*2.2.3*). 8,0 až 10,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním jí na 20 ml. Měří se roztok 10 min po rozpuštění.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +258° až +287°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 62,5 mg v roztoku *hydrogenftalanu draselného R* (4 g/l) a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*), jak je uvedeno ve Stanovení obsahu. Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (d) a eluuje se izokraticky do eluce píku ampicilinu. Nastříkne se 50 µl zkoušeného roztoku (b) a začne se izokratická eluce. Ihned po eluci píku ampicilinu se použije následující lineární gradient. Jestliže složení mobilní fáze bylo upraveno k požadovanému rozlišení, použije se v čase 0 gradientové eluce upravené složení.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 - 30	85 → 0	15 → 100	lineární gradient
30 - 45	0	100	izokraticky
45 - 60	85	15	ustalování

Nastříkne se mobilní fáze A a použije se stejný eluční postup k provedení slepé zkoušky. Nastříkne se porovnávací roztok (e) a použije se stejný eluční postup. Chromatogram porovnávacího roztoku (e) vykazuje pík ampicilinu a pík dimeru s relativním retenčním časem 2,8 vzhledem k ampicilinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není plocha žádného píku odpovídajícího dimeru ampicilinu větší než 4,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (4,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Dichlormethan. Nejvýše 0,2 %, stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *dichlorethanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 ml *dichlorethanu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Porovnávací roztok. 1,0 ml *dichlormethanu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *makrogolu 1000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C, teplota nástřikového prostoru na 100 °C a teplota detektoru na 150 °C. Vypočítá se obsah dichlormethanu s použitím hustoty, která je při teplotě 20 °C 1,325 g/ml.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,15 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 31,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). Připraví se těsně před použitím. 31,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 27,0 mg *ampicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na *25*,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (e). K 0,20 g zkoušené látky se přidá 1,0 ml *vody R*. Roztok se zahřívá 1 h při 60 °C. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktedecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A* je směs 0,5 ml *kyseliny octové zředěné RS,* 50 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a 50 ml *acetonitrilu R* zředěná *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* je směs 0,5 ml *kyseliny octové zředěné RS,* 50 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a 400 ml *acetonitrilu R* zředěná *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se stabilizuje mobilní fází, v níž poměr fází A : B je 85 : 15. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení na chromatogramu mezi dvěma hlavními píky

je nejméně 3,0. Je-li třeba, upraví se poměr A : B mobilní fáze. Kapacitní poměr pro první pík (ampicilin) je 2,0 až 2,5.

Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (c). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl nejméně 3. Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a).

Procentuální obsah sodné soli ampicilinu se vypočítá vynásobením procentuálního obsahu ampicilinu faktorem 1,063.

Uchovávání

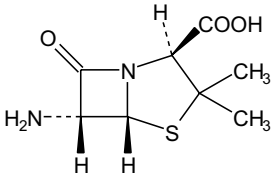
Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

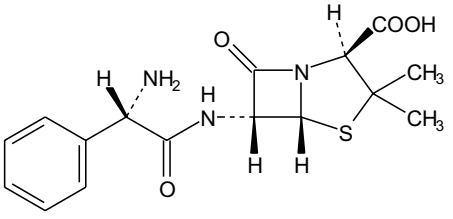
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

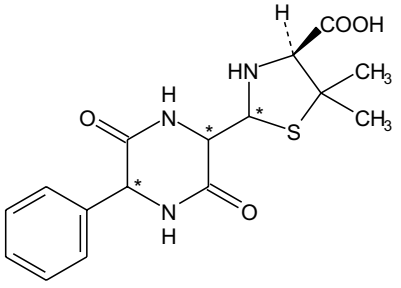
Nečistoty



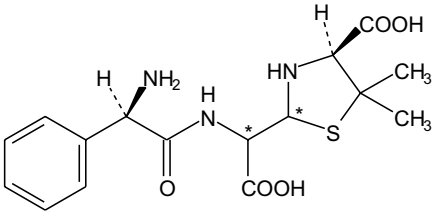
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



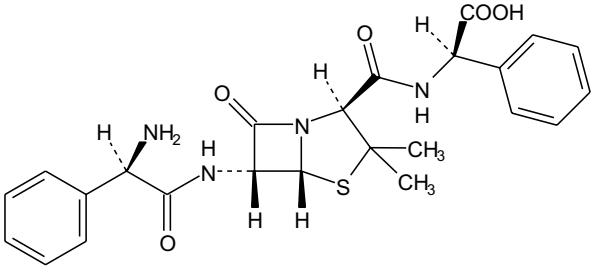
B. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*S*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (L-ampicilin),



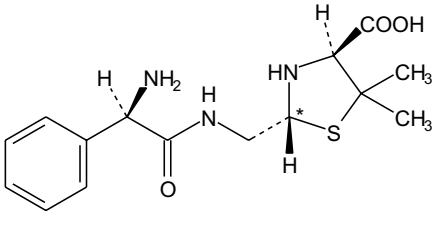
C. kyselina (4*S*)-2-(5-fenyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (diketopiperaziny ampicilinu),



D. kyselina(4*S*)-2-{[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-karboxymethyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4--karboxylová (penicilové kyseliny ampicilinu),

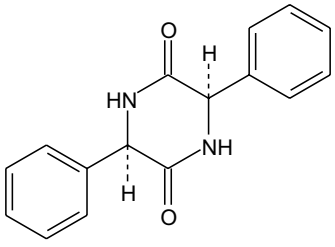


E. kyselina (*R*)-2-{[[(2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*)-2-[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4--thia-1-azabicyklo[3,2,0]hept-2-yl]karbonyl]amino}-2-fenyloctová [ampicilinyl-D-(4-fenylglycin),

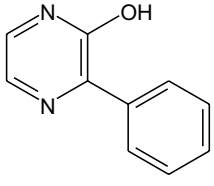


a epimer k C*

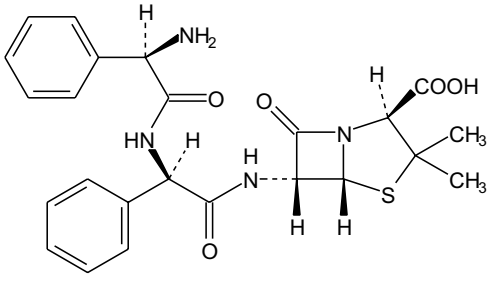
F. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny ampicilinu),



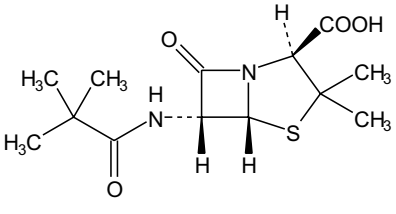
G. (3*R*,6*R*)-3,6-difenylpiperazin-2,5-dion,



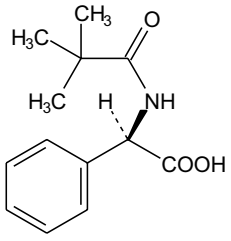
H. 3-fenylpyrazin-2-ol,



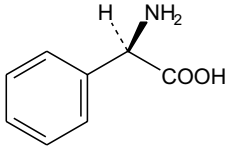
I. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-{(2*R*)-2-[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-2-fenylacetamido}-3,3-di--methyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (D-fenylglycylampicilin),



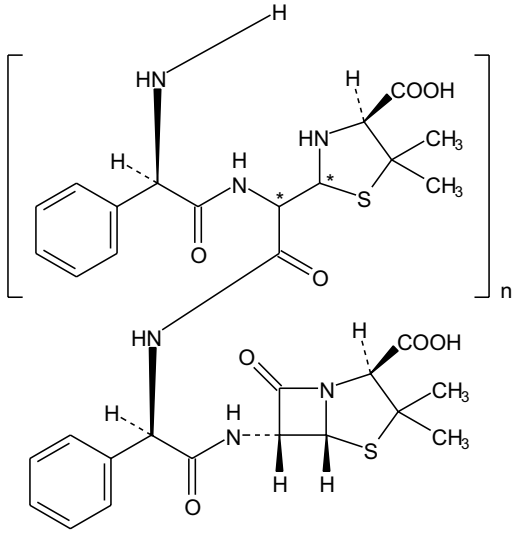
J. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-(2,2-dimethylpropionamido)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo-[3,2,0]heptan-2- karboxylová,



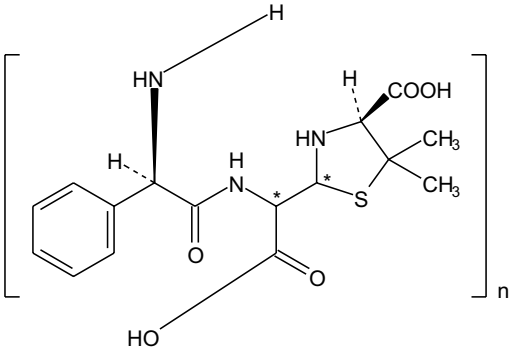
K. kyselina (2*R*)-2-(2,2-dimethylpropionamido)-2-fenyloctová,



L. kyselina (2*R*)-2-amino-2-fenyloctová (D-fenylglycin),



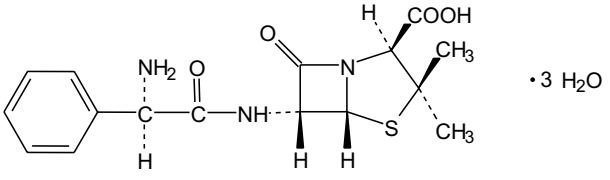
M. ko-oligomery ampicilinu a penicilových kyselin ampicilinu,



N. oligomery penicilových kyselin ampicilinu.

† Ampicillinum trihydricum

Trihydrát ampicilinu



$C_{16}H_{19}N_3O_4S$. $3H_2O$ M_r 403,45 CAS 7177-48-2

Je to trihydrát kyseliny (6*R*)-6-[2-amino-2-fenylacetamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{19}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%, v etheru a v mastných olejích. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *trihydrátu ampicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *trihydrátu ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS.*

Porovnávací roztok (b). 25 mg *trihydrátu amoxicilinu CRL* a 25 mg *trihydrátu ampicilinu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R*, (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm. Zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

D. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Odděleně se rozpustí 1,0 g v 10 ml *amoniaku zředěného RS2*. Roztoky ihned po rozpuštění neopalizují více než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 5,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 40 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +280° až +305°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 62,5 mg ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Nejvýše 1,0 %; stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) uvedenou ve Stanovení obsahu.

Nastříkne se porovnávací roztok (c) a izokraticky se eluuje. Nastříkne se čerstvě připravený zkoušený roztok (b) a izokraticky se začne eluovat. Ihned po eluci píku ampicilinu se použije následující lineární gradient. Jestliže složení mobilní fáze bylo upraveno k požadovanému rozlišení, použije se v čase 0 gradientové eluce upravené složení.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0	85	15
30	0	100
45	0	100

Kolona se ustaluje 15 min původní zvolenou fází. Nastříkne se mobilní fáze A a použije se stejná gradientová eluce k provedení slepé zkoušky.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) plocha žádného píku, kromě hlavního píka a píků pozorovaných při slepé zkoušce, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.8)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se ve zkumavce se zabroušenou zátkou přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 12,0 % až 15,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 31,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml
Zkoušený roztok (b). 31,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 27,0 mg *ampicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 5,0 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí mobilní fází A na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,25 m dlouhé a o vnitřním průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A*, kterou je směs 0,5 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 50 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a 50 ml *acetonitrilu R* zředěná *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B*, kterou je směs 0,5 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 50 ml *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l RS* a 400 ml *acetonitrilu* zředěná *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 50 µl.

Kolona se stabilizuje mobilní fází, v níž poměr fází A : B je 85 : 15. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 3,0. Je-li třeba, upraví se poměr fází A : B. Kapacitní poměr pro první pík (ampicilin) je 2,0 až 2,5. Nastříkne se porovnávací roztok (d). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl

nejméně 3. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %.

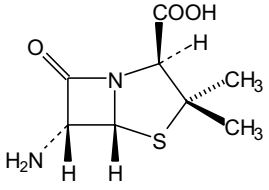
Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a). Vypočítá se procentuální obsah ampicilinu.

Uchovávání

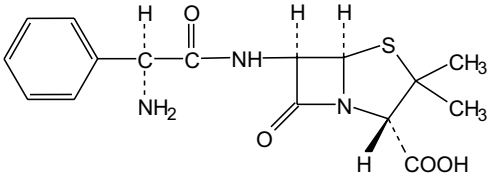
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Separandum.

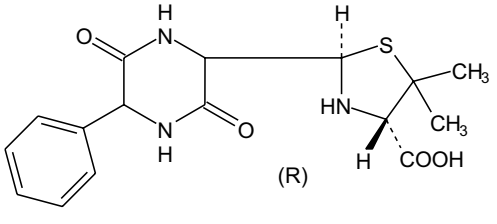
Nečistoty



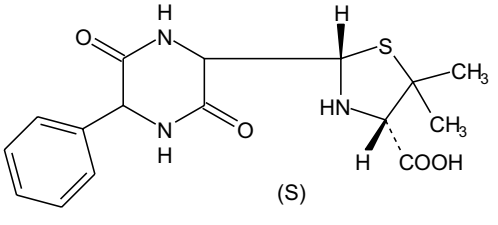
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



B. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(*S*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo-[3,2,0]heptan-2-karboxylová (L-ampicilin),

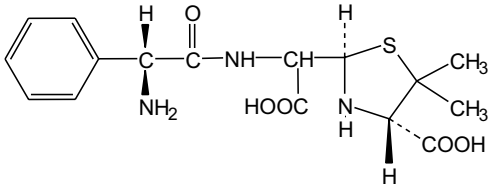


(R)

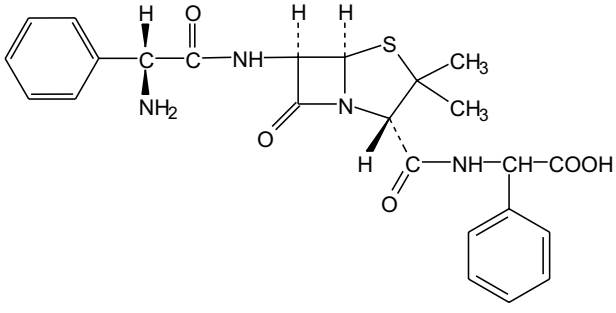


(S)

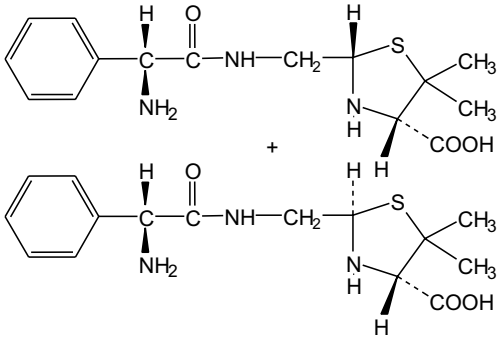
C. kyselina (*RS*)-5,5-dimethyl-2-(3,6-dioxo-5-fenylpiperazin-2-yl)thiazolidin-4-karboxylová,



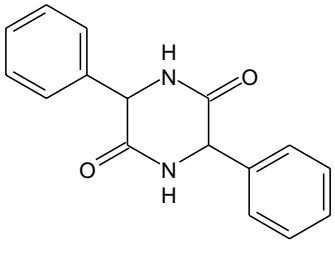
D. kyselina (2*R*,4*S*)-2-{(*RS*)-1-karboxy-1-[(*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny ampicilinu),



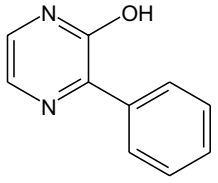
E. fenylglycylamid ampicilinu,



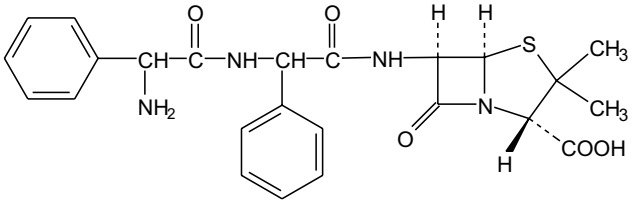
F. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-[(*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]methyl-5,5-dimethylthiazolidin-4--karboxylová (penilové kyseliny ampicilinu),



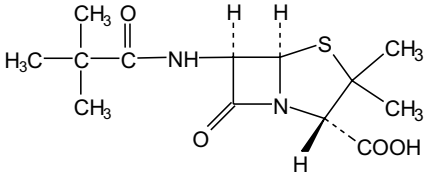
G. 3,6-difenylpiperazin-2,5-dion,



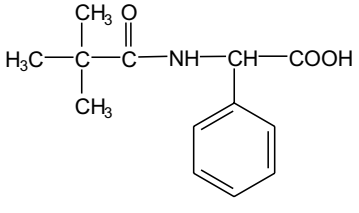
H. 3-fenylpyrazin-2-ol,



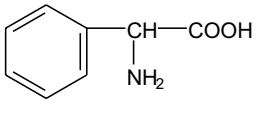
I. fenylglycylampicilin,



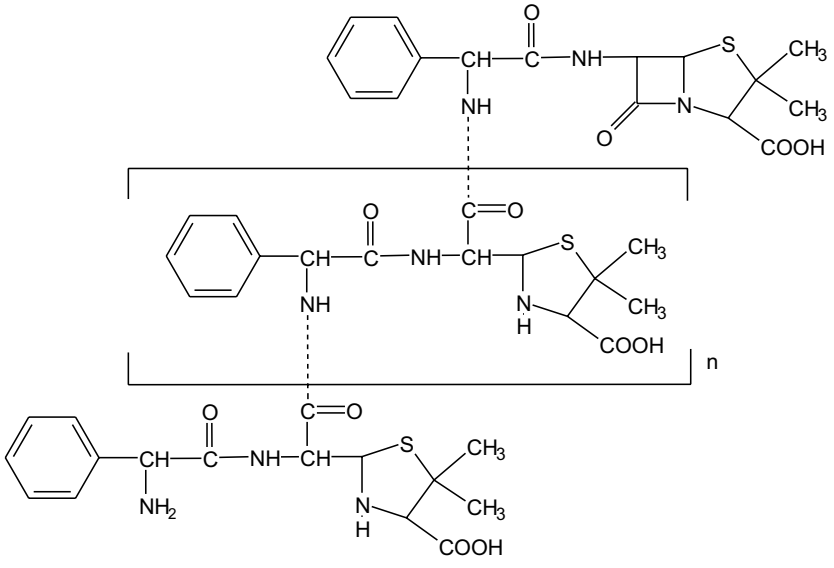
J. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-(2,2-dimethylpropanamido)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová,



K. kyselina 2-(2,2-dimethylpropanamido)-2-fenyloctová,



L. 2-fenylglycin,



M. oligomery ampicilinu a penicilových kyselin ampicilinu.

Amygdalae oleum

Mandlový olej

Synonymum. Oleum amygdalae

CAS 8007-69-0

Je to olej získaný lisováním za studena ze zralých semen druhu *Prunus dulcis* (MILL.) D.A. WEBB *var. dulcis* nebo *Prunus dulcis* (MILL.) D.A. WEBB var. *amara* (D.C.) BUCHHEIM nebo směs obou druhů.

Vlastnosti

Žlutá čirá průhledná kapalina. Je těžce rozpustný v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým. Tuhne při teplotě asi -18 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Absorbance, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se zkouška Totožnost mastných olejů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.2*). Chromatogram zkoušeného roztoku se shoduje s charakteristickým chromatogramem pro mandlový olej.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,911 až 0,920.

Absorbance *(2.2.25)*. 0,100 g se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml. Absorbance roztoku měřená při 264 nm až 276 nm je nejvýše 0,20.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 10,0.

Nezmýdelnitelné látky *(2.5.7)*. Nejvýše 0,7 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Cizí mastné oleje. Provede se zkouška Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií *(2.4.22)*. Podíl mastných kyselin má toto složení:
- nasycené mastné kyseliny s délkou řetězce méně než C_{16}: nejvýše 0,1 %,
- kyselina palmitová: 4,0 % až 9,0 %,
- kyselina palmitolejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 16,3): nejvýše 0,6 %,
- kyselina margarová: nejvýše 0,2 %,
- kyselina stearová: nejvýše 3,0 %,
- kyselina olejová (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 18,3): 62,0 % až 86,0 %,
- kyselina linolová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 18,9): 20,0 % až 30,0 %,
- kyselina linolenová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 19,7): nejvýše 0,4 %,
- kyselina arachidová: nejvýše 0,1 %,
- kyselina gadolejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 20,3): nejvýše 0,1 %,
- kyselina behenová: nejvýše 0,1 %,
- kyselina eruková (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 22,3): nejvýše 0,1 %.

Steroly. Provede se zkouška Steroly v mastných olejích *(2.4.23)*. Podíl sterolů obsahuje:
- cholesterol: nejvýše 0,7 %,
- kampesterol: nejvýše 4,0 %,
- stigmasterol: nejvýše 3,0 %,
- β-sitosterol: 73,0 % až 87,0 %,
- Δ5-avenasterol: nejméně 10,0 %,
- Δ7-avenasterol: nejvýše 3,0 %,
- Δ7-stigmastenol: nejvýše 3,0 %,
- fukosterol: nejvýše 2,0 %,
- brassikasterol: nejvýše 0,3 %.

Meruňkový nebo broskvový olej. 2 ml se 5 min protřepávají se směsí 1 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a 1 ml *vody R*. Po oddělení vrstev nevznikne v žádné z nich růžové nebo hnědé zbarvení.

Sezamový olej. 10 ml se asi 1 min protřepává v odměrném válci se zabroušenou zátkou se směsí 0,5 ml roztoku *furfuralu R* (3,5 ml/l) v *acetanhydridu R* a 4,5 ml *acetanhydridu R*. Zfiltruje se filtračním papírem smočeným v *acetanhydridu R*. K filtrátu se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R*; nevznikne modrozelené zbarvení.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Amygdalae oleum raffinatum

Mandlový olej čištěný

Synonymum. Oleum amygdalae raffinatum

Je to olej získaný čištěním a deodorizací mandlového oleje získaného ze zralých semen druhu *Prunus dulcis* (MILL.) D.A. WEBB var. *dulcis* nebo *Prunus dulcis* (MILL.) D.A. WEBB var. *amara* (D.C.) BUCHHEIM nebo směs obou druhů. Může obsahovat vhodný antioxidant.

Vlastnosti

Slabě žlutá čirá průhledná kapalina. Je těžce rozpustný v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým.

Tuhne při teplotě asi -18 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se zkouška Totožnost olejů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.2*). Chromatogram zkoušeného roztoku se shoduje s charakteristickým chromatogramem pro mandlový olej.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,911 až 0,920.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 0,5; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo peroxidové *(2.5.5).* Nejvýše 5,0.

Nezmýdelnitelné látky *(2.5.7)* Nejvýše 0,7 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Cizí mastné oleje. Provede se zkouška Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií *(2.4.22)*. Podíl mastných kyselin má toto složení:
- nasycené mastné kyseliny s délkou řetězce méně než C_{16}: nejvýše 0,1 %,
- kyselina palmitová: 4,0 % až 9,0 %,
- kyselina palmitolejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 16,3): nejvýše 0,6 %,
- kyselina margarová: nejvýše 0,2 %,
- kyselina stearová: nejvýše 3,0 %,
- kyselina olejová (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 18,3): 62,0 % až 86,0 %,
- kyselina linolová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 18,9): 20,0 % až 30,0 %,
- kyselina linolenová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 19,7): nejvýše 0,4 %,
- kyselina arachidová: nejvýše 0,1 %,
- kyselina gadolejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 20,3): nejvýše 0,1 %,
- kyselina behenová: nejvýše 0,1 %,
- kyselina eruková (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 22,3): nejvýše 0,1 %.

Steroly. Provede se zkouška Steroly v mastných olejích *(2.4.23).* Podíl sterolů obsahuje:
- cholesterol: nejvýše 0,7 %,
- kampesterol: nejvýše 4,0 %,
- stigmasterol: nejvýše 3,0 %,
- β-sitosterol: 73,0 % až 87,0 %,
- Δ5-avenasterol: nejméně 10,0 %,

- Δ7-avenasterol: nejvýše 3,0 %,
- Δ7-stigmastenol: nejvýše 3,0 %,
- fukosterol: nejvýše 2,0 %,
- brassikasterol: nejvýše 0,3 %.

Meruňkový nebo broskvový olej. 2 ml se 5 min protřepávají se směsí 1 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a 1 ml *vody R*. Po oddělení vrstev nevznikne v žádné z nich růžové nebo hnědé zbarvení.

Sezamový olej. 10 ml se asi 1 min protřepává v odměrném válci se zabroušenou zátkou se směsí 0,5 ml roztoku *furfuralu R* (3,5 ml/l) v *acetanhydridu R* a 4,5 ml *acetanhydridu R*. Zfiltruje se filtračním papírem smočeným v *acetanhydridu R*. K filtrátu se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R*; nevznikne modrozelené zbarvení.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Jestliže je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, obsahuje nejvýše 0,3 % vody; stanoví se s 3,000 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu parentálních lékových forem,
- název a koncentrace přidaného antioxidantu.

Anisi etheroleum

Anýzová silice

Synonyma. Anisi aetheroleum, Oleum anisi

Je to silice získaná ze zralých suchých plodů druhu *Pimpinella anisum* L. nebo *Illicium verum* HOOK. fil. destilací s vodní parou.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo světle žlutá kapalina za chladu tuhnoucí. Je prakticky nerozpustná ve vodě, mísitelná s lihem 96%, etherem, etherem petrolejovým a dichlormethanem.

Zkoušky totožnosti

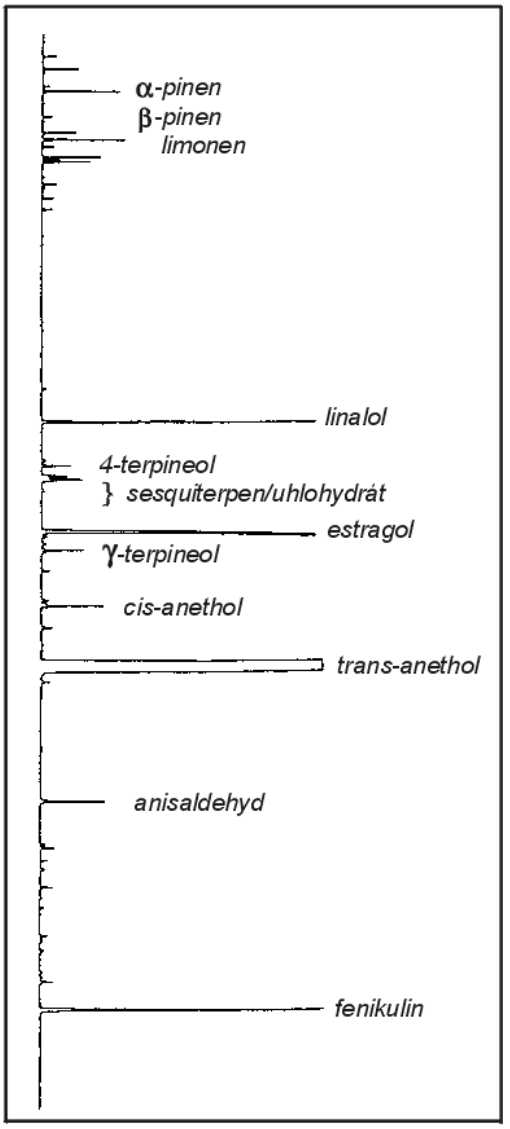
Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 1 g zkoušené látky se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 80 μl *anetholu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 1 ml.
Porovnávací roztok (b). 3 μl *anisaldehydu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 1 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 μl *linalolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 1 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (7 + 93) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). V horní třetině chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *zkoumadlem vanilinovým R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se do 10 min v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) a oranžově růžová skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na čele chromatogramu je fialová skvrna (monoterpeny). U silice z *P. anisum* může být ještě hnědá skvrna bezprostředně nad skvrnou odpovídající anisaldehydu.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil, viz Zkoušky na čistotu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je šest píků, které svými retenčními časy odpovídají šesti píkům na chromatogramu porovnávacího roztoku.



Obr. 1. Vzor chromatogramu silice z druhu *Illicium verum*

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota (*2.2.5*). 0,978 až 0,994.

Index lomu (*2.2.6*). 1,552 až 1,561.

Teplota tuhnutí (*2.2.18*). 15 °C až 19 °C.

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 1,0; 5,0 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice (*2.8.7*).
Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Chromatografický profil. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. Zkoušená látka.
Porovnávací roztok. Jednotlivé složky se odváží tak, aby jejich celkové množství činilo asi 20 %. K 1 g *hexanu R* se přidá 20 mg *linalolu R*, 20 mg *estragolu R*, 20 mg *α-terpineolu R*, 10 mg *cis--anetholu R*, 60 mg *anetholu R* a 30 mg *anisaldehydu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 30 m až 60 m vnitřního průměru 0,3 mm s vnitřní stěnou pokrytou vrstvou *makrogolu 20 000 R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 4 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 2 °C/min až na 210 °C, při níž se udržuje 15 min,
- teploty nástřikového prostoru 180 °C až 210 °C a detektoru 220 °C až 250 °C.

Nastříkne se 0,2 μl porovnávacího roztoku. Při dodržení předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

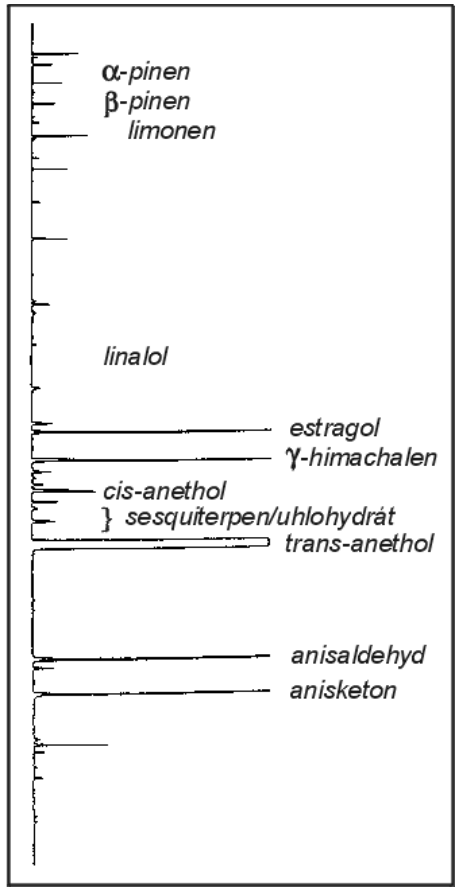
Zkoušku lze hodnotit, jestliže počet teoretických pater je nejméně 30 000, počítáno od píku estragolu při 120 °C, a je-li rozlišení mezi píky estragolu a α-terpineolu nejméně 1,3 při 130 °C.

Nastříkne se asi 0,2 μl zkoušeného roztoku. Porovnáním retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikuje šest látek, přítomných na chromatogramu zkoušeného roztoku (nepřihlíží se k píku odpovídajícímu *hexanu R*).

Obsah jednotlivých látek v procentech se stanoví metodou absolutní kalibrace.

Obsah látek v procentech se pohybuje v rozmezí:

linalol	0,1 % až 1,5 %
estragol	0,5 % až 6,0 %
α-terpineol	0,1 % až 1,5 %
cis-anethol	nejvýše 0,5 %
trans-anethol	84,0 % až 93,0 %
anisaldehyd	0,1 % až 3,5 %



Obr. 2. Vzor chromatogramu silice z druhu *Pimpinella anisum*

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem a teplem.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda silice pochází z druhu *P. anisum* nebo *I. verum*.

Vzor chromatogramu je uveden pro informaci a jako návod při aplikaci analytické metody. Netvoří součást požadavků článku.

Anisi fructus

Anýzový plod

Synonymum. Fructus anisi vulgaris

Je to celá usušená dvojnažka druhu *Pimpinella anisum* L.
Obsahuje nejméně 20 ml silice v 1 kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga má charakteristický pach po anetholu. Je to obvykle celá dvojnažka, často s malým zbytkem tenké tuhé lehce zakřivené stopky.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Dvojnažka je vejčitá nebo hruškovitá, z boku lehce zmáčklá, žlutozelená nebo zelenošedá, 3 mm až 5 mm dlouhá a až 3 mm široká, ukončená stylopodiem se dvěma krátkými, nazpět ohnutými konci. Nažky jsou na vrcholu spojené karpoforem; poutcová strana je plochá, hřbetní strana vypouklá s krátkými bradavčitými chlupy viditelnými pod lupou. Nažky mají pět primárních podélných, málo výrazných žeber světlejší barvy, tři hřbetní a dvě postranní.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelenožlutý až hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: krycí chlupy nebo jejich úlomky jsou většinou jednobuněčné, někdy zakřivené, na konci tupé, s bradavčitou kutikulou nebo jejich úlomky; úlomky pokožky s buňkami se zvrásněnou kutikulou, někdy s anomocytickými průduchy, úlomky četných úzkých rozvětvených siličných kanálků, úlomky endospermu s aleuronovými zrny a malými drúzami šťavelanu vápenatého; podlouhlé sklereidy z poutcové strany, svazky sklerenchymatických vláken karpoforu a stopky. Škrob chybí.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,10 g práškované drogy (1500) se protřepává 15 min s 2 ml *dichlormethanu R*. Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří do sucha ve vodní lázni při 60 °C. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 3 μl *anetholu R* a 40 μl *oleje olivového R* se rozpustí v 1 ml *toluenu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně ve vzdálenostech 2 cm 2 μl a 3 μl zkoušeného roztoku a 1 μl, 2 μl a 3 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se *toluenem R* po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Ve střední části chromatogramů je patrna skvrna anetholu. Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá se 5 min při 120 °C. Skvrny odpovídající anetholu jsou zbarveny modře. Skvrna anetholu na chromatogramu zkoušeného roztoku při nanášce 2 μl převyšuje velikostí a intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce 1 μl a nepřevyšuje velikostí a intenzitou skvrnu porovnávacího roztoku při nanášce 3 μl. Na chromatogramech zkoušeného roztoku je v dolní třetině patrna skvrna odpovídající svojí polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (triacylglyceroly olivového oleje).

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 7,0 %; stanoví se s 20,0 g práškované drogy.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,5 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 10,0 g drogy (710) upráškované bezprostředně před použitím se destiluje 2 h rychlostí 2,5 ml/min až 3,5 ml/min v baňce na 250 ml se 100 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Anisi stellati fructus

Plod badyáníku

Synonymum. Fructus anisi stellati

Je to usušené souplodí druhu *Illicium verum* HOOK. fil. Obsahuje nejméně 70 ml silice v 1 kilogramu drogy, vztaženo na sušinu.

Vlastnosti

Je to souplodí složené z měchýřků. Každý měchýřek asi 12 mm až 20 mm dlouhý a 6 mm až 11 mm široký. Semena až 8 mm dlouhá. Plodolisty jsou hnědé, charakteristického pachu po anetholu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Souplodí složeno ze šesti až jedenácti (obvykle osmi) často nepravidelně vyvinutých člunkovitých měchýřků, paprsčitě uspořádaných kolem krátkého středního, tupě zakončeného sloupku. Mohou být přítomny jednotlivé měchýřky a semena.

Distální část každého měchýřku je protažena v tupý zobákovitý hrot. Zevní strana měchýřku je červenohnědá až šedohnědá, hrubě vrásčitá; vnitřní strana lesklá, červenohnědá, hladká. Zralé měchýřky mají nahoře podélnou trhlinu, odhalující jedno tvrdé, vejčité, ze stran zmáčknuté, lesklé, hnědé semeno. Plodní stopka malá, s distální částí silně zakřivenou, často chybí.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: hnědé buňky epikarpu, při pohledu shora mnohohranné, se silně zvrásněnou kutikulou a příležitostně s anomocytickými průduchy (*2.8.3*); úlomky endokarpu s palisádovými buňkami až 600 μm dlouhými; úlomky mezokarpu s velkými parenchymatickými buňkami; cévy; siličné buňky a skupiny velkých, dlouze

protáhlých sklereid se ztlustlými, tečkovanými stěnami; úlomky semen s palisádovými, žlutými sklereidami až 200 μm dlouhými se silně tečkovanými stěnami; úlomky endospermu s kapkami oleje a aleuronovými zrny; oddělené úlomky sloupku a plodní stopky se silně ztlustlými sklereidami nepravidelného tvaru až 400 μm dlouhými a až 150 μm širokými, zašpičatělými, částečně hvězdovitými (astrosklereidy); kosočtverečné nebo hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého.

C. Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky na čistotu *Illicium anisatum.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrny skvrny (anethol, triacylglyceroly) odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Illicium anisatum. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 100 μl roztoku ze zkoušky Stanovení obsahu (roztok silice v xylenu).
Porovnávací roztok (a). 3 μl *anetholu R* a 50 μl *oleje olivového R* se rozpustí v 1 ml *toluenu R.*
Porovnávací roztok (b). 1 μl *myristicinu R* se rozpustí v 10 ml *toluenu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *hexanu R* a *toluenu R* (50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, pak se postříká čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R.* Zahřívá se 5 min při 120 °C. Skvrny odpovídající sloučeninám porovnávacích roztoků jsou modré. Skvrna odpovídající myristicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se nachází v poloze vymezené skvrnami anetholu a triacylglycerolů olivového oleje na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrna skvrna myristicinu.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi. Souplodí neobsahuje měchýřky s protáhlým, nahoru otočeným zobákovitým hrotem, s plodní stopkou přímou, nezakřivenou na distálním konci (souplodí druhu *Illicium anisatum* L. syn. *I. religiosum* SIEB. et ZUCC.).

Voda, semimikrostanovení (*2.2.13*). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 20,0 g práškované drogy.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 4,0 %.

Stanovení obsahu

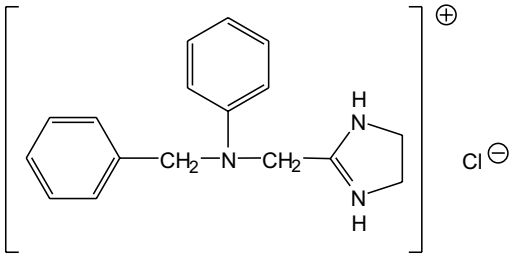
Provede se Stanovení silic v drogách (*2.8.12*). 50,0 g drogy se bezprostředně před stanovením rozdrobní na hrubý prášek (1400) a promíchá se. Asi 10,0 g této směsi se rozdrobní na jemný prášek (710). 2,50 g práškované drogy (710) se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min. Použije se baňka na 250 ml, 100 ml *vody R* jako destilační tekutiny a 0,50 ml *xylenu R* do dělené trubice.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Antazolini hydrochloridum

Antazoliniumchlorid



$C_{17}H_{20}ClN_3$ M_r 301,82 CAS 2508-72-7

Je to 2-(N-benzyl-N-fenylaminomethyl)-2-imidazoliniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{20}ClN_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v dichlormethanu.

Taje při asi 240 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky a *chloridu draselného R* se shoduje se spektrem tablety *antazoliniumchloridu CRL* a *chloridu draselného R.*

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v denním světle po postřiku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztok (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

C. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se po kapkách přidává *hydroxid sodný zředěný RS* do alkalické reakce, zfiltruje se a sraženina se promyje dvakrát 10 ml *vody R.* Sraženina se vysuší v exsikátoru za sníženého tlaku a stanoví se její teplota tání *(2.2.14)*, která je 119 °C až 123 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím na 60 °C, ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a po ochlazení se zředí stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *0,01 ml hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*. Vrstva se před použitím 15 min zahřívá při 110 °C.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *antazoliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *xylometazoliniumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *methanolem R* na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se 15 min suší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny. Potom se vrstva postříká směsí stejných objemových dílů roztoku *chloridu železitého R* (200 g/l) a roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (5 g/l) a ihned se pozoruje v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 100 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se *hydroxidem draselným v lihu 0,1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,18 mg $C_{17}H_{20}ClN_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

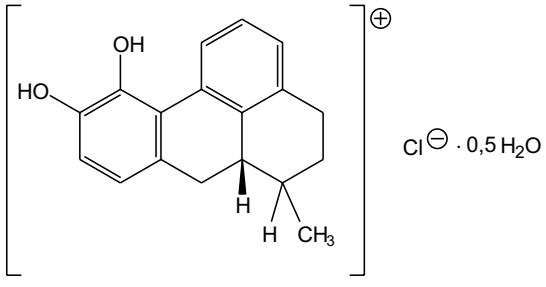
Nečistoty

A. N-(*2*-aminoethyl)-2-[(benzyl)(fenyl)amino]acetamid.

† Apomorphini hydrochloridum

Apomorfiniumchlorid

Synonymum. Apomorphinium chloratum



$C_{17}H_{18}ClNO_2$. $0,5H_2O$ M_r 312,80 CAS 41372-20-7

M_r bezvodého 303,79

Je to hemihydrát (6a*R*)-5,6,6a,7-tetrahydro-10,11-dihydroxy-6-methyl-4*H*-dibenzo[*de,g*]chinoliniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{18}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý až zelenavě šedý, krystalický prášek nebo krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru. Na vzduchu a světle se barví zřetelně zeleně.

Zkoušky totožnosti

A. 10,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm *(2.2.25)*. Absorpční maximum roztoku je při 273 nm a prodleva při 300 nm až 310 nm. Specifická absorbance v maximu je 530 až 570.

B. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá několik mililitrů *hydrogenuhličitanu sodného RS*; vylučuje se bílá sraženina, která se zvolna barví zeleně. Přidá se 0,25 ml *jodu 0,05 mol/l RS* a protřepe se; sraženina se zbarví šedozeleně. Sraženina se odfiltruje; po rozpuštění v *etheru R* vzniká červeně zbarvený roztok, po rozpuštění v *chloroformu R* vzniká fialovomodře zbarvený roztok a po rozpuštění v *lihu 96% R* vzniká modrý roztok.

C. K 2 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *kyseliny dusičné R*, promíchá se a zfiltruje. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S (10 ml) je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený takto: 5 mg zkoušené látky se rozpustí ve 100 ml *vody R*. K 1 ml tohoto roztoku

se přidá 6 ml *vody R*, 1 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS*, 0,5 ml *jodu 0,05 mol/l VS*, po 30 s 0,6 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 10 ml.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -48° až -52°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,25 g v *kyselině chlorovodíkové 0,02 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Morfin. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonitrilu R, ethylacetatu R, dichlormethanu R, kyseliny mravenčí bezvodé R* a *vody R* (30 + 30 + 30 + 5 + 5) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *dusitanu sodného R* (30 g/l) a vystaví se na několik minut v uzavřené nádobě parám amoniaku. Po vyjmutí se ponechá 1 h stát na světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se neobjeví žádná červenooranžová skvrna o R_F, které je 0,3 až 0,5násobkem R_F hlavní skvrny (asi 2 % morfinu).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže je na chromatogramu porovnávacího roztoku zřetelně viditelná skvrna.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 2,5 % až 4,2 %; suší se 0,50 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 7 ml *octanu rtuťnatého RS*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,38 mg $C_{17}H_{18}ClNO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Aprotinini solutio concentrata

Koncentrovaný roztok aprotininu

Je to koncentrovaný roztok aprotininu, což je polypeptid sestávající z řetězce padesáti osmi aminokyselin. Stechiometricky inhibuje účinnost několika proteolytických enzymů, jako jsou chymotrypsin, kalikrein, plasmin a trypsin. Obsahuje nejméně 15,0 Ph.Eur.j. účinnosti aprotininu v mililitru.

Výroba

Získává se extrakcí hovězí tkáně a čistí vhodným způsobem, např. gelovou filtrací. Zvířata, ze kterých se aprotinin získává, musí splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená

pro humánní konzumaci. Pokud se pro výrobu použije tkáň hovězího původu, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí tkáně, jež se má použít, se má vzít v úvahu relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské unie "Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosu původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků" (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Vyrábí se validovanými metodami extrakce a čistění v podmínkách zajišťujících minimální mikrobiologickou kontaminaci; výrobní metody musí prokazatelně redukovat jakoukoliv kontaminaci viry nebo jinými původci infekce na přijatelné limity.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok S, viz Zkoušky na čistotu.
Porovnávací roztok. Použije se roztok *aprotininu BRP*.

Na vrstvu se nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *kyseliny octové ledové R* (80 + 100) obsahující 0,10 g *octanu sodného R* na 1 ml směsi po dráze 12 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva usuší volně na vzduchu a postříká se roztokem 0,1 g *ninhydrinu R* ve směsi 6 ml roztoku *chloridu měďnatého R* (10 g/l), 21 ml *kyseliny octové ledové R* a 70 ml *ethanolu R*. Vrstva se usuší při 60 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Stanoví se schopnost přípravku inhibovat účinnost trypsinu.

Zkoušený roztok. 1 ml roztoku S se zředí *tlumivým roztokem o pH 7,2* na 50 ml.
Roztok trypsinu. 10 mg *trypsinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,002 mol/l RS* a zředí se jí na 100 ml.
Roztok kaseinu. 0,2 g *kaseinu R* se rozpustí v *tlumivém roztoku o pH 7,2* a zředí se jím na 100 ml.
Srážecí roztok. Je to směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethanolu R* (1 + 49 + 50).

1 ml zkoušeného roztoku se smíchá s 1 ml roztoku trypsinu, směs se nechá 10 min stát, potom se přidá 1 ml roztoku kaseinu a inkubuje se 30 min při 35 °C. Směs se ochladí v ledové lázni, přidá se 0,5 ml srážecího roztoku a po protřepání se směs nechá stát 15 min při pokojové teplotě; roztok se zakalí. Postup se opakuje s *tlumivým roztokem o pH 7,2* místo zkoušeného roztoku; roztok zůstane čirý.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Připraví se roztok obsahující 15 Ph.Eur.j. v mililitru. Připraví se, je-li třeba, ředěním podle účinnosti uvedené v označení na obalu zkoušeného přípravku.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*.

Absorbance *(2.2.25)*. Připraví se roztok obsahující 3,0 Ph.Eur.j./ml ve *vodě R* a měří se absorbance při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 277 nm a jeho absorbance v maximu je nejvýše 0,80.

Proteinové nečistoty o vyšší relativní molekulové hmotnosti. Zkoušený přípravek se lyofilizuje při tlaku 2,7 Pa a teplotě -30 °C. Lyofilizace, včetně dosušení při 15 °C až 25 °C, by měla trvat 6 h až 12 h. Zkouška se provede vylučovací chromatografií *(2.2.30)* za použití *dextranu síťovaného pro chromatografii R2*. K bobtnání gelu se použije roztok *kyseliny octové bezvodé R* (180 g/l) a stejné rozpouštědlo se použije jako eluční roztok. Připraveným gelem se naplní chromatografická kolona o délce 0,8 m až 1,0 m a průměru 25 mm tak, aby sloupec neobsahoval vzduchové bubliny. Na horní konec sloupce se nanese množství zkoušené látky odpovídající 300 Ph.Eur.j. rozpuštěné v 1 ml roztoku *kyseliny octové bezvodé R* (180 g/l) a eluuje se stejným rozpouštědlem. Odebírají se eluáty po 2 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* každého odebraného eluátu v absorpčním maximu při 277 nm a naměřené hodnoty se vynesou do grafu. Na získaném chromatogramu není přítomno žádné absorpční maximum před elucí aprotininu.

Specifická účinnost vysušené látky. Nejméně 3,0 Ph.Eur.j. účinnosti v 1 miligramu vysušeného přípravku. 25,0 ml zkoušeného přípravku se odpaří na vodní lázni do sucha, zbytek se suší 15 h při 110 °C a zváží se. Vypočítá se počet Ph.Eur.j. připadající na 1 miligram vysušené látky z hmotnosti vysušeného zbytku a účinnosti zjištěné při Stanovení obsahu.

Neškodnost *(2.6.9)*. Vyhovuje zkoušce na neškodnost. Každé myši se vstříkne 0,5 ml roztoku zkoušeného přípravku ve *vodě na injekci R* obsahujícího množství odpovídající 2 Ph.Eur.j.

Histamin *(2.6.10)*. Nejvýše 0,2 µg ve 3 Ph.Eur.j., přepočteno na bázi histaminu.

Sterilita *(2.6.1)*. Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Pokud je přípravek určen pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstřikuje 1,0 ml roztoku zkoušené látky obsahujícího 15 Ph.Eur.j./ml.

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví měřením inhibičního působení na roztok trypsinu o známé účinnosti. Inhibiční účinnost se vypočítá z rozdílu mezi počáteční a zbytkovou účinností trypsinu.

Inhibiční účinnost zkoušeného přípravku se vyjadřuje v jednotkách Ph.Eur.j. 1 Ph.Eur.j. inhibuje 50 % enzymové účinnosti 2 µkat trypsinu.

Použije se reakční nádobka o objemu asi 30 ml vybavená: temperovacím zařízením na (25 ± 0,1) °C, míchadlem (např. magnetickým míchadlem), uzávěrem s pěti otvory pro upevnění elektrod, špičky byrety, trubičky pro přívod dusíku a přidávání zkoumadel. Je možné použít manuální titraci nebo automatický titrátor. V případě manuální titrace má být byreta dělena po 0,05 ml a pH-metr má mít jemně dělenou stupnici a skleněnou a kalomelovou elektrodu.

Zkoušený roztok. Vhodným ředěním (*D*) zkoušeného přípravku se připraví roztok v *tlumivém roztoku boritanovém o pH 8,0 (0,0015 mol/l)* tak, aby jeho koncentrace činila asi 1,67 Ph.Eur.j./ml. *Roztok trypsinu*. Připraví se roztok *trypsinu CRL* obsahující asi 0,8 µkat/ml (asi 1 mg/ml) v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS*. Použije se čerstvě připravený roztok a při zkoušce se uchovává v ledové lázni.

Roztok trypsinu a aprotininu. Ke 4,0 ml roztoku trypsinu se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku. Směs se okamžitě zředí na 40,0 ml *tlumivým roztokem boritanovým o pH 8,0* (0,0015 mol/l), nechá se stát 10 min při pokojové teplotě a potom se ponoří do ledové lázně. Roztok je použitelný 6 h.
Zředěný roztok trypsinu. 0,5 ml roztoku trypsinu se zředí na 10,0 ml *tlumivým roztokem boritanovým o pH 8,0* (0,0015 mol/l) a nechá se 10 min stát při pokojové teplotě a potom se uchovává v ledové lázni.

Reakční nádobka se nasytí dusíkem a za stálého míchání se přidá 9,0 ml *tlumivého roztoku boritanového o pH 8,0* (0,0015 mol/l) a 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *benzoylargininethylesterhydrochloridu R* (6,9 g/l). Upraví se pH směsi na 8,0 pomocí *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Po vytemperování nádobky na (25 ± 0,1) °C se přidá 1,0 ml roztoku trypsinu a aprotininu a začne se měřit čas reakce. pH se udržuje na hodnotě 8,0 přidáváním *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a měří se přidaný objem každých 30 s po dobu 6 min. Vypočte se počet mililitrů *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za 1 sekundu (n_1 ml). Tato titrace se provede také se zředěným roztokem trypsinu. Vypočte se počet mililitrů *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* spotřebovaného za 1 sekundu (n_2 ml).

Vypočte se účinnost v Ph.Eur.j. v 1 mililitru ze vzorce:

$$4000\ (2n_2 - n_1)\ .\ D,$$

v němž značí:
D - zřeďovací faktor zkoušeného přípravku k získání koncentrace 1,67 Ph.Eur.j/ml. Nalezená hodnota účinnosti je v rozmezí 90 % až 110 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zabezpečených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet Ph.Eur.j. v 1 mililitru,
- zda je přípravek sterilní,
- zda je přípravek prostý pyrogenních látek.

† Aprotininum

Aprotinin

$C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$ M_r 6511,46 CAS 9087-70-1

Je to polypeptid, který se skládá z řetězce padesáti osmi aminokyselin. Stechiometricky inhibuje účinnost několika proteolytických enzymů, jako je chymotrypsin, kalikrein, plasmin a trypsin. Obsahuje nejméně 3,0 Ph.Eur.j. účinnosti aprotininu v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Výroba

Získává se extrakcí hovězí tkáně a čištěním vhodným způsobem, např. gelovou filtrací. Zvířata, ze kterých se aprotinin získává, musí splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro humánní konzumaci. Pokud se pro výrobu použije tkáň hovězího původu, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí tkáně, jež se má použít, se má vzít do úvahy relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské unie "Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosů původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Vyrábí se validovanými metodami extrakce a čistění v podmínkách zajišťujících minimální mikrobiologickou kontaminaci; výrobní metody musí prokazatelně redukovat jakoukoliv kontaminaci viry nebo jinými původci infekce na přijatelné limity.

Vlastnosti

Téměř bílý hygroskopický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v izotonických roztocích, prakticky nerozpustný v organických rozpouštědlech.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok S, viz Zkoušky na čistotu.
Porovnávací roztok. Použije se roztok *aprotininu BRP*.

Na vrstvu se nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *kyseliny octové ledové R* (80 + 100) obsahující 0,10 g *octanu sodného R* na 1 ml směsi po dráze 12 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva usuší volně na vzduchu a postříká se roztokem 0,1 g *ninhydrinu R* ve směsi 6 ml roztoku *chloridu měďnatého R* (10 g/l), 21 ml *kyseliny octové ledové R* a 70 ml *ethanolu R*. Vrstva se usuší při 60 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Stanoví se schopnost zkoušené látky inhibovat účinnost trypsinu.

Zkoušený roztok. 1 ml roztoku S se zředí *tlumivým roztokem o pH 7,2* na 50 ml.
Roztok trypsinu. 10 mg *trypsinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,002 mol/l RS* a zředí se jí na 100 ml.
Roztok kaseinu. 0,2 g *kaseinu R* se rozpustí v *tlumivém roztoku o pH 7,2* a zředí se jím na 100 ml.
Srážecí roztok. Je to směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethanolu R* (1 + 49 + 50).

1 ml zkoušeného roztoku se smíchá s 1 ml roztoku trypsinu, směs se nechá 10 min stát, potom se přidá 1 ml roztoku kaseinu a inkubuje se 30 min při 35 °C. Směs se ochladí v ledové lázni, přidá se 0,5 ml srážecího roztoku a po protřepání se směs nechá stát 15 min při pokojové teplotě; roztok se zakalí. Postup se opakuje s *tlumivým roztokem o pH 7,2* místo zkoušené látky; roztok zůstane čirý.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Připraví se roztok obsahující 15 Ph.Eur.j. v mililitru. Koncentrace se stanoví podle účinnosti značené na obalu zkoušené látky.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*.

Absorbance *(2.2.25)*. Připraví se roztok obsahující 3,0 Ph.Eur.j./ml ve *vodě R* a měří se absorbance při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 277 nm a jeho absorbance v maximu je nejvýše 0,80.

Proteinové nečistoty o vyšší relativní molekulové hmotnosti. Stanoví se vylučovací chromatografií *(2.2.30)* za použití *dextranu síťovaného pro chromatografii R2*. K bobtnání gelu se použije roztok *kyseliny octové bezvodé R* (180 g/l) a stejné rozpouštědlo se použije jako eluční roztok. Připraveným gelem se naplní chromatografická kolona o délce 0,8 m až 1,0 m a průměru 25 mm tak, aby sloupec neobsahoval vzduchové bubliny. Na horní konec sloupce se nanese množství zkoušené látky odpovídající 300 Ph.Eur.j. rozpuštěné v 1 ml roztoku *kyseliny octové bezvodé R* (180 g/l) a eluuje se stejným rozpouštědlem. Odebírají se eluáty po 2 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* každého odebraného eluátu v absorpčním maximu při 277 nm a naměřené hodnoty se vynesou do grafu. Na získaném chromatogramu není přítomno žádné absorpční maximum před elucí aprotininu.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 6,0 %; suší se 0,100 g látky ve vakuu.

Neškodnost *(2.6.9)*. Vyhovuje zkoušce na neškodnost. Každé myši se vstříkne 0,5 ml roztoku zkoušené látky ve *vodě na injekci R* obsahujícího množství odpovídající 2 Ph.Eur.j.

Histamin *(2.6.10)*. Nejvýše 0,2 µg ve 3 Ph.Eur.j., přepočteno na bázi histaminu.

Sterilita *(2.6.1)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstřikuje 1,0 ml roztoku zkoušené látky, obsahujícího 15 Ph.Eur.j./ml.

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušené látky se stanoví měřením inhibičního působení na roztok trypsinu o známé účinnosti. Inhibiční účinnost se vypočítá z rozdílu mezi počáteční a zbytkovou účinností trypsinu.

Inhibiční účinnost zkoušené látky se vyjadřuje v jednotkách Ph.Eur.j. 1 Ph.Eur.j. inhibuje 50 % enzymové účinnosti 2 µkat trypsinu.

Použije se reakční nádobka o objemu asi 30 ml vybavená: temperovacím zařízením na (25 ± 0,1) °C, míchadlem (např. magnetickým míchadlem), uzávěrem s pěti otvory pro upevnění elektrod, špičky byrety, trubičky pro přívod dusíku a přidávání zkoumadel. Je možné použít manuální titraci nebo automatický titrátor. V případě manuální titrace má být byreta dělena po 0,05 ml a pH-metr má mít jemně dělenou stupnici a skleněnou a kalomelovou elektrodu.

Zkoušený roztok. Připraví se roztok v *tlumivém roztoku boritanovém o pH 8,0 (0,0015 mol/l)* tak, aby jeho koncentrace činila asi 1,67 Ph.Eur.j./ml, tj. asi 0,6 mg (*m* mg) na mililitr.

Roztok trypsinu. Připraví se roztok *trypsinu CRL* obsahující asi 0,8 µkat/ml (asi 1 mg/ml) v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS*. Použije se čerstvě připravený roztok a při zkoušce se uchovává v ledové lázni.

Roztok trypsinu a aprotininu. Ke 4,0 ml roztoku trypsinu se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku. Směs se okamžitě zředí na 40,0 ml *tlumivým roztokem boritanovým o pH 8,0* (0,0015 mol/l), nechá se stát 10 min při pokojové teplotě a potom se ponoří do ledové lázně. Roztok je použitelný 6 h.
Zředěný roztok trypsinu. 0,5 ml roztoku trypsinu se zředí na 10,0 ml *tlumivým roztokem boritanovým o pH 8,0* (0,0015 mol/l) a nechá se 10 min stát při pokojové teplotě a pak se uchovává v ledové lázni.

Reakční nádobka se nasytí dusíkem a za stálého míchání se přidá 9,0 ml *tlumivého roztoku boritanového o pH 8,0* (0,0015 mol/l) a 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *benzoylargininethylesterhydrochloridu R* (6,9 g/l). Upraví se pH směsi na hodnotu 8,0 pomocí *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Po vytemperování nádobky na (25 ± 0,1) °C se přidá 1,0 ml roztoku trypsinu a aprotininu a začne se měřit čas reakce. pH se udržuje na 8,0 přidáváním *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a měří se přidaný objem každých 30 s po dobu 6 min. Vypočte se počet mililitrů *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za 1 sekundu (n_1 ml). Tato titrace se provede také se zředěným roztokem trypsinu. Vypočte se počet mililitrů *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* spotřebovaného za 1 sekundu (n_2 ml).

Vypočte se účinnost v Ph.Eur.j. v 1 miligramu ze vzorce:

$$\frac{4000(2n_2 - n_1)}{m}.$$

Nalezená hodnota účinnosti je v rozmezí 90 % až 110 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zabezpečených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet Ph.Eur.j. v 1 miligramu,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá pyrogenních látek.

Aqua pro iniectione

Voda na injekci

Synonymum. Aqua ad iniectabilia

H_2O M_r 18,02 CAS 7732-18-5

Látka je určená k přípravě a výrobě léčivých přípravků pro parenterální podání, a to buď jako vehikulum (nerozplněná), nebo k rozpouštění či ředění léčivých látek nebo léčivých přípravků pro parenterální podání před použitím (sterilizovaná voda na injekci).

Voda na injekci nerozplněná

Získává se destilací pitné nebo čistěné vody. Části destilačních přístrojů, které přicházejí do styku s vodou, jsou z neutrálního skla, křemene nebo vhodného kovu. Destilační přístroj je vybaven výkonným zařízením pro zachytávání unášených kapiček. Přístroj musí vyrábět vodu prostou pyrogenních látek a k tomu je nezbytné udržovat jej v bezvadném technickém stavu. První část destilátu získaná na počátku destilace se odstraní. Destilát se shromažďuje a uchovává za podmínek, které brání růstu mikroorganismů a zamezují jinému znečištění.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina, bez chuti, prostá pyrogenních látek.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,0; měří se roztok obsahující 0,3 ml nasyceného roztoku *chloridu draselného R* ve 100 ml zkoušené látky.

Oxidovatelné látky. Ke 100 ml se přidá 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a 5 min se vaří; roztok zůstane slabě růžový.

Chloridy. K 10 ml se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,2 ml *dusičnanu stříbrného RS2*; vzhled roztoku se do 15 min nezmění.

Dusičnany. 5 ml ve zkumavce se vloží do lázně s ledovou vodou, přidá se 0,4 ml roztoku *chloridu draselného R* (100 g/l), 0,1 ml *difenylaminu RS* a po kapkách za protřepávání 5 ml *kyseliny sírové R*. Zkumavka se přemístí na 15 min do vodní lázně zahřáté na 50 °C. Případně vzniklé modré zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 4,5 ml *vody prosté dusičnanů R* a 0,5 ml základního *roztoku dusičnanů (2 μg NO_3/ml)* (0,2 μg/g).

Sírany. K 10 ml se přidá 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,1 ml *chloridu barnatého RS1*; vzhled roztoku se do 1 h nezmění.

Amonium. Ke 20 ml se přidá 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS*. Po 5 min se roztok pozoruje ve zkumavce podél svislé osy. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený současně přidáním 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* ke směsi 4 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml) R* a 16 ml *vody prosté amonia R* (0,2 μg/g).

Vápník a hořčík. Ke 100 ml se přidají 2 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10*, 50 mg *černi eriochromové T s chloridem sodným R* a 0,5 ml *edetanu disodného 0,01 mol/l VS*; vznikne jasně modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 150 ml se zahřívá ve skleněné odpařovací misce na vodní lázni do zmenšení objemu na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy *(0,1 μg/g)*. Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Hliník *(2.4.17)*. Je-li látka určena k přípravě dialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník. Ke 400 ml se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,01 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Provede se slepá zkouška za použití směsi 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Zbytek po odpaření. 100 ml se odpaří na vodní lázni a dosuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1 mg (0,001 %).

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v 1 ml. Stanoví se za použití Agarové půdy B membránovou filtrací.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v 1 ml.

Sterilizovaná voda na injekci

Je to voda na injekci rozplněná do vhodných nádob, nejlépe skleněných (*3.2.1*) nebo z jiného vhodného schváleného materiálu, uzavřených a sterilizovaných teplem za podmínek, které zajistí, aby výrobek zůstal prostý pyrogenních látek. Připravuje se z vody na injekci nerozplněné.

Vlastnosti

Zkouší se za vhodných podmínek viditelnosti. Je to čirá bezbarvá kapalina, prakticky prostá mechanických nečistot. Každá nádoba obsahuje dostatečné množství látky, které umožní, aby mohl být odebrán jmenovitý objem.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje požadavkům uvedeným v odstavci Voda na injekci nerozplněná, se změnami ve zkouškách Kysele nebo zásaditě reagující látky místo zkoušky Hodnota pH, Chloridy (jestliže jmenovitý objem nádoby není větší než 100 ml), Oxidovatelné látky a Zbytek po odpaření; zkouška Sterilita místo zkoušky Mikrobiální znečistění.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 20 ml se přidá 0,05 ml *červeně fenolové RS*. Pokud je roztok žlutý, přidáním 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se zbarví červeně. Pokud je roztok červený, přidáním 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* se zbarví žlutě.

Oxidovatelné látky. 100 ml se vaří s 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Pak se přidá 0,2 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a vaří se 5 min. Roztok zůstane slabě růžový.

Chloridy *(2.4.4)*. Pro nádoby o jmenovitém objemu 100 ml nebo méně vyhovuje 15 ml limitní zkoušce na chloridy (0,5 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 1,5 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)* a 13,5 ml *vody R*. Roztok se pozoruje podél svislé osy zkumavky.

Zbytek po odpaření. 100 ml se odpaří na vodní lázni a dosuší se při 100 °C až 105 °C. Pro nádoby o jmenovitém objemu 10 ml nebo méně zbytek váží nejvýše 4 mg (0,004 %). Pro nádoby o jmenovitém objemu větším než 10 ml zbytek váží nejvýše 3 mg (0,003 %).

Sterilita *(2.6.1)*. Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v 1 ml.

Voda na injekci nerozplněná **N**

Vyhovuje následujícím dodatečným zkouškám.

Měrná vodivost (*2.2.38*). Nejvýše 3 μS.cm^{-1}.

Volný chlor.

Základní roztok volného chloru. 0,025 g *dichromanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml (roztok A).

1,50 g *síranu měďnatého R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 1 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml (roztok B).

10,5 ml roztoku A se smíchá s 9,5 ml roztoku B (základní roztok). Roztok je použitelný po dobu 3 měsíců.

Postup. K 19 ml se přidá 1 ml *o-tolidinu RS*; po 5 min není zbarvení roztoku intenzivnější než současně připravený stejný objem porovnávacího roztoku připraveného těsně před použitím zředěním 5 ml základního roztoku volného chloru *vodou R* na 20 ml (0,05 μg/g).

Aqua purificata

Čištěná voda

Synonyma. Aqua demineralisata, Aqua destillata

H_2O M_r 18,02 CAS 7732-18-5

Je to voda určená pro výrobu a přípravu léčivých přípravků a zdravotnických prostředků, u nichž není požadováno, že mají být sterilní a prosté pyrogenních látek, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Výroba

Čištěná voda se připravuje z pitné vody destilací, za použití iontoměničů nebo jinou vhodnou metodou z vody, která vyhovuje požadavkům na pitnou vodu (ČSN 75 7111).

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina, bez chuti.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,0; měří se roztok obsahující 0,3 ml nasyceného roztoku *chloridu draselného R* ve 100 ml zkoušené látky.

Oxidovatelné látky. Ke 100 ml se přidá 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a 5 min se vaří; roztok zůstane slabě růžový.

Chloridy. K 10 ml se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,2 ml *dusičnanu stříbrného RS2*; vzhled roztoku se do 15 min nezmění.

Dusičnany. 5 ml ve zkumavce se vloží do lázně s ledovou vodou, přidá se 0,4 ml roztoku *chloridu draselného R* (100 g/l), 0,1 ml *difenylaminu RS* a po kapkách za protřepávání 5 ml *kyseliny sírové R*. Zkumavka se přemístí na 15 min do vodní lázně zahřáté na 50 °C. Případně vzniklé modré zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 4,5 ml *vody prosté dusičnanů R* a 0,5 ml základního *roztoku dusičnanů (2 μg NO_3/ml)* (0,2 μg/g).

Sírany. K 10 ml se přidá 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,1 ml *chloridu barnatého RS1*; vzhled roztoku se do 1 h nezmění.

Amonium. Ke 20 ml se přidá 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* a po 5 min se roztok pozoruje ve zkumavce podél svislé osy. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený současně přidáním 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* ke směsi 4 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)* a 16 ml *vody prosté amonia R* (0,2 μg/g).

Vápník a hořčík. Ke 100 ml se přidají 2 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10, 50 mg černi eriochromové T s chloridem sodným R* a 0,5 ml *edetanu disodného 0,01 mol/l VS*; vznikne jasně modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 150 ml se zahřívá ve skleněné odpařovací misce na vodní lázni do zmenšení objemu na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (0,1 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Hliník *(2.4.17)*. Je-li látka určena k přípravě dialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník. Ke 400 ml se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,01 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Provede se slepá zkouška za použití směsi 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Zbytek po odpaření. 100 ml se odpaří na vodní lázni a dosuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1 mg (0,001 %).

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v 1 ml. Stanoví se za použití Agarové půdy B membránovou filtrací.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Jestliže je látka určená k výrobě dialyzačních roztoků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v mililitru.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, které nemění vlastnosti vody.

Označování

V označení se uvede, zda je látka vhodná pro přípravu dialyzačních roztoků.

Čištěná voda vyhovuje následujícím dodatečným zkouškám.

N

Měrná vodivost (*2.2.38*). Nejvýše 6 $\mu S.cm^{-1}$.

Volný chlor.

Základní roztok volného chloru. 0,025 g *dichromanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml (roztok A).

1,50 g *síranu měďnatého R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 1 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml (roztok B).

10,5 ml roztoku A se smíchá s 9,5 ml roztoku B (základní roztok). Roztok je použitelný po dobu 3 měsíců.

Postup. K 19 ml se přidá 1 ml *o-tolidinu RS*; po 5 min není zbarvení roztoku intenzivnější než současně připravený stejný objem porovnávacího roztoku připraveného těsně před použitím zředěním 5 ml základního roztoku volného chloru *vodou R* na 20 ml (0,05 μg/g).

Čištěná voda pro přípravu léčivých přípravků získaná destilací, demineralizací nebo jinou vhodnou metodou, u níž není zaručena požadovaná mikrobiologická jakost, se zbaví vhodným způsobem zárodků, např. varem po dobu nejméně 10 min a následným ochlazením nebo filtrací filtry zadržujícími bakterie. Tato voda se uchovává v dobře uzavřených zásobních obalech, nejlépe skleněných, sterilizovaných nebo jiným vhodným způsobem zbavených zárodků nejvýše 24 h při pokojové teplotě.

Při zkoušce Mikrobiální znečištění navíc vyhovuje zkoušce na nepřítomnost mikrobů z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa* (*2.6.13*).

Arachidis oleum

Podzemnicový olej

Synonymum. Oleum arachidis

CAS 8002-03-7

Je to čištěný olej získaný z loupaných semen druhu *Arachis hypogaea* L.

Vlastnosti

Čirá nažloutlá viskózní kapalina. Je velmi těžce rozpustný v lihu 96%, mísitelný s etherem a s etherem petrolejovým.

Tuhne při asi 2 °C.

Zkoušky totožnosti

Provede se zkouška Totožnost mastných olejů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.2*). Chromatogram zkoušeného roztoku se shoduje s charakteristickým chromatogramem pro podzemnicový olej.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,912 až 0,918.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 0,6.

Pokud je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, vyhovuje požadavku: Nejvýše 0,5.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5,0.

Nezmýdelnitelný podíl *(2.5.7)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Zásaditě reagující látky v olejích *(2.4.19)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Zásaditě reagující látky v olejích.

Cizí mastné oleje. Provede se zkouška Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií (*2.4.22*). Podíl mastných kyselin má toto složení:

- nasycené mastné kyseliny s délkou řetězce méně než C_{16}: nejvýše 0,4 %,
- kyselina palmitová: 7,0 % až 16,0 %,
- kyselina stearová: 1,3 % až 6,5 %,

- kyselina olejová (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 18,3): 35,0 % až 72,0 %,
- kyselina linolová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 18,9): 13,0 % až 43,0 %,
- kyselina linolenová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 19,7): nejvýše 0,6 %,
- kyselina arachidová: 1,0 % až 3,0 %,
- kyselina gadolejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 20,3): 0,5 % až 2,1 %,
- kyselina behenová: 1,0 % až 5,0 %,
- kyselina eruková (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 22,3): nejvýše 0,5 %,
- kyselina lignocerová: 0,5 % až 3,0 %.

Poměr kyseliny linolové ke kyselině behenové je nejvýše 15.

Polovysychavé oleje. 1,0 g se vaří 5 min pod zpětným chladičem s 5 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l VS* (1 + 3). Přidá se 1,5 ml *kyseliny octové R* a 50 ml *lihu R* 70 % (*V/V*); směs se zahřívá tak dlouho, dokud nevznikne čirý roztok. Do zvolna chladnoucí tekutiny se vloží teploměr; tekutina se začíná kalit při teplotě vyšší než 36 C.

Sezamový olej. 10 ml se asi 1 min protřepává v odměrném válci se zabroušenou zátkou se směsí 0,5 ml roztoku *furfuralu R* (3,5 ml/l) v *acetanhydridu R* a 4,5 ml *acetanhydridu R*. Zfiltruje se filtračním papírem smočeným v *acetanhydridu R*. K filtrátu se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R*, nevznikne modrozelené zbarvení.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, vyhovuje následující zkoušce.

Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 3,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterální lékových forem,
- název a koncentrace přidaného antioxidantu.

---

† Argenti nitras

Dusičnan stříbrný

Synonymum. Argentum nitricum

$AgNO_3$ M_r 169,87 CAS 7761-88-8

Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $AgNO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo průsvitné bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 10 mg vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

B. 10 mg vyhovuje zkoušce na stříbro *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS*; roztok je zbarven modře. Ke 2 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně fenolové RS*; roztok je zbarven žlutě.

Cizí soli. K 30 ml roztoku S se přidá 7,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a důkladně se protřepe. Roztok se 5 min zahřívá na vodní lázni a zfiltruje se. 20 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a vysuší se při 100 C až 105 C. Zbytek váží nejvýše 2 mg (nejvýše 0,3 %).

Hliník, olovo, měď a bizmut. 1,0 g se rozpustí ve směsi 4 ml *amoniaku 26% R* a 6 ml *vody R*; roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 2 ml *síranu amonno-železitého RS2*. Titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do červenožlutého zbarvení.

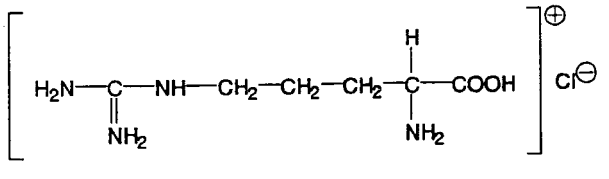
1 ml *thiokyanatanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,99 mg $AgNO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených nekovových obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Arginini hydrochloridum

Argininiumchlorid



$C_6H_{15}ClN_4O_2$ M_r 210,66 CAS 1119-34-2

Je to (*S*)-1-(4-karboxy-4-aminobutyl)guanidiniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{15}ClN_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *argininiumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 25 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 1 ml *1-naftolu RS* a 2 ml směsi stejných objemových dílů *chlornanu sodného RS a vody R*; vzniká červené zbarvení.

E. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +21,0° až +23,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *argininiumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *argininiumchloridu CRL* a 10 mg *lysiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, vysuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C do úplného vymizení pachu amoniaku, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívají se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,180 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny hnědožlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,07 mg $C_6H_{15}ClN_4O_2$.

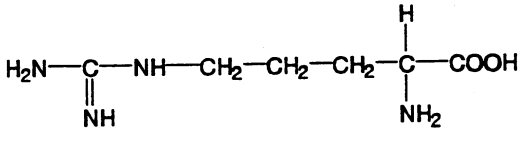
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Argininum

Arginin

Synonyma. L-Argininum, L-arginin



$C_6H_{14}N_4O_2$ M_r 174,20 CAS 74-79-3

Je to kyselina (*S*)-2-amino-5-guanidinopentanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{14}N_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je silně alkalický *(2.2.4)*.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *argininu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Asi 25 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 1 ml *1-naftolu RS* a 2 ml směsi stejných objemových dílů *chlornanu sodného RS* a *vody R*; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +25,5° až +28,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *argininu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *argininu CRL* a 10 mg *lysiniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, vysuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C do úplného vymizení pachu amoniaku, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. K 5 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 10 ml roztoku S se přidá 1,7 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívají se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a za použití 0,2 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do změny zbarvení ze zeleného na fialově červené.

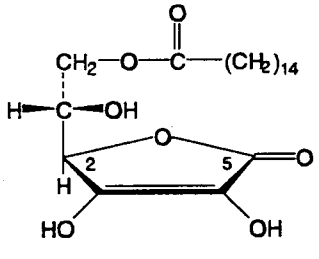
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,42 mg $C_6H_{14}N_4O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Ascorbylis palmitas

Askorbylpalmitat



$C_{22}H_{38}O_7$ M_r 414,54 CAS 137-66-6

Je to {(*S*)-2-[(*R*)-2,5-dihydro-3,4-dihydroxy-5-oxo-2-furyl]-2-hydroxyethyl}hexadekanoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{38}O_7$.

Vlastnosti

Bílý až nažloutlý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v methanolu a prakticky nerozpustný v dichlormethanu a v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se *s referenčním spektrem Ph. Eur. askorbylpalmitatu*.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R*. Tento roztok odbarvuje *dichlorfenolindofenol RS*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_4$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +21° až +24°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 5 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,160 g se rozpustí v 50 ml *methanolu R*, přidá se 30 ml *vody R*, 1 ml *škrobu RS* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do trvalého modrofialového zbarvení.

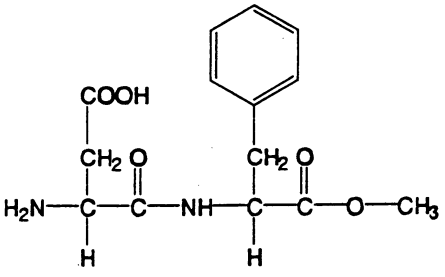
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 20,73 mg $C_{22}H_{38}O_7$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C.

Aspartamum

Aspartam



$C_{14}H_{18}N_2O_5$ $_r$ 294,31 CAS 22839-47-0

Je to kyselina (*S*)-3-amino-N-[(*S*)-1-(methoxykarbonyl)-2-fenylethyl]sukcinamová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{14}H_{18}N_2O_5$.

Vlastnosti

Bílý krystalický slabě hygroskopický prášek. Je mírně až těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v hexanu a dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maxima při 247 nm, 252 nm, 258 nm a při 264 nm.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *aspartamu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 15 mg se rozpustí ve 2,5 ml *vody R* a zředí se *kyselinou octovou R* na 10 ml. *Porovnávací roztok.* 15 mg *aspartamu CRL* se rozpustí ve 2,5 ml *vody R* a zředí se *kyselinou octovou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, kyseliny mravenčí bezvodé R, methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 4 + 30 + 64) po dráze 15 cm. Potom se vrstva vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 20 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R*, přidá se 1 ml *hydroxylaminu alkalického RS1* a 15 min se zahřívá na vodní lázni. Po ochlazení se upraví pH *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* pH na hodnotu 2 a přidá se 0,1 ml *chloridu železitého RS1*; vznikne hnědočervené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,8 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Měrná vodivost *(2.2.38)*. Nejvýše 30 μS.cm^{-1}. 0,80 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se vodivost tohoto roztoku (C_1) a *vody R* použité jako rozpouštědlo (C_2). Odečtené hodnoty musí být stálé v rozmezí 1 % po dobu 30 s.

Měrná vodivost se vypočítá podle vztahu:

$$C_1 - 0{,}992 \,.\, C_2.$$

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +14,5° až +16,5°, počítáno na vysušenou látku a měřeno do 30 min po přípravě roztoku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 2,00 g v roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (690 g/l) a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,60 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (1,5 + 98,5) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 9,0 mg *aspartam nečistoty A CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (1,5 + 98,5) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 30,0 mg *fenylalaninu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml. 3,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 30,0 mg *L-aspartyl-L-fenylalaninu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R a vody R* (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (b).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (6,8 g/l) (10 + 90), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 3,7,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Pak se nastříkne 20 μl porovnávacího roztoku (d). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky fenylalaninu a L-aspartyl-L-fenylalaninu není menší než 3,5. Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času aspartamu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku odpovídajícího aspartam nečistotě A větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %); plocha žádného píku odpovídajícího fenylalaninu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech ostatních píků, kromě

hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 4,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 1,5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a v 60 ml *kyseliny octové ledové R* a ihned se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,43 mg $C_{14}H_{18}N_2O_5$.

Uchovávání

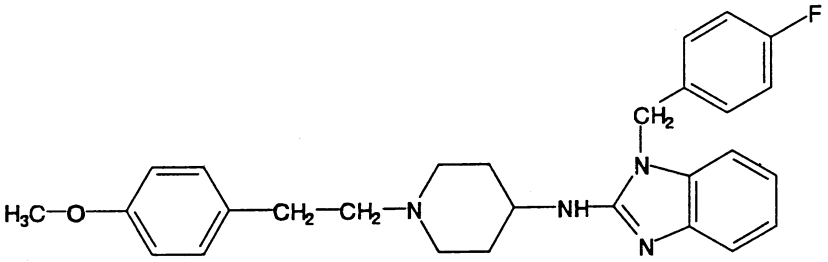
Ve vzduchotěsných obalech.

Nečistoty

A. kyselina 2-(5-benzyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)octová (diketopiperazin),
B. L-aspartyl-L-fenylalanin,
C. fenylalanin.

† Astemizolum

Astemizol



$C_{28}H_{31}FN_4O$ M_r 458,58 CAS 68844-77-9

Je to 1-[(4-fluorfenyl)methyl]-N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]-4-piperidyl}-1*H*-benzimidazol-2--amin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{28}H_{31}FN_4O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu a v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 175 °C až 178 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *astemizolu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *astemizolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *astemizolu CRL* a 30 mg *ketokonazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS, dioxanu R a methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min proudem teplého vzduchu, vystaví se působení jodových par do vzniku zřetelných skvrn a potom se pozoruje v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku svou polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do vzniku téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se ochladit, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do odbarvení roztoku a zfiltruje se. 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanoxidu zirkoničitého RS,* promíchá se a nechá 5 min stát. Zbarvení tohoto roztoku se porovná s kontrolním roztokem získaným za stejných podmínek při slepé zkoušce; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *astemizolu CRL* a 25 mg *ketokonazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm, naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (3 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min s následujícím lineárním gradientovým programem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)	Poznámka
0	95	5	začátek gradientu
15	80	20	konec gradientu
18	0	100	promývání
23	95	5	přepnutí na počáteční podmínky
28 = 0	95	5	začátek dalšího programu

- *mobilní fáze A* - 17 g *tetrabutylammoniumhydrogensulfatu R* se rozpustí v 1 l *vody R,*
- *mobilní fáze B* - *Acetonitril R,*
- spektrofotometrického detektoru, 278 nm.

Kolona se ustaluje 30 min promýváním *acetonitrilem R*, potom se nastaví počáteční podmínky a ještě 5 min se ustaluje. Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b) a citlivost systému se nastaví tak, aby na chromatogramu výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: ketokonazolu asi 8 min a astemizolu asi 9 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ketokonazolu a astemizolu není menší než 1,5. V případě potřeby se upraví konečná koncentrace acetonitrilu nebo procentuální obsah tetrabutylammoniumhydrogensulfatu v mobilní fázi, nebo se upraví časový program lineární gradientové eluce.

Nastříkne se odděleně 10 µl *methanolu R* jako kontrolní roztok, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacícho roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla (kontrolní roztok) a k píkům s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,93 mg $C_{28}H_{31}FN_4O$.

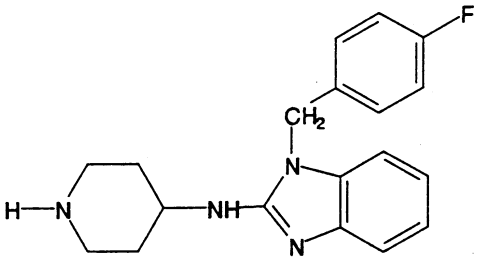
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

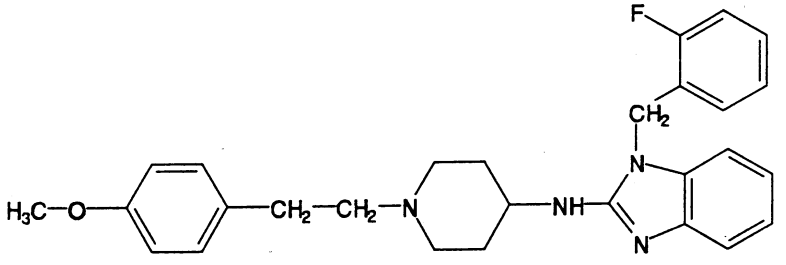
Separandum.

1000 *† Astemizolum*

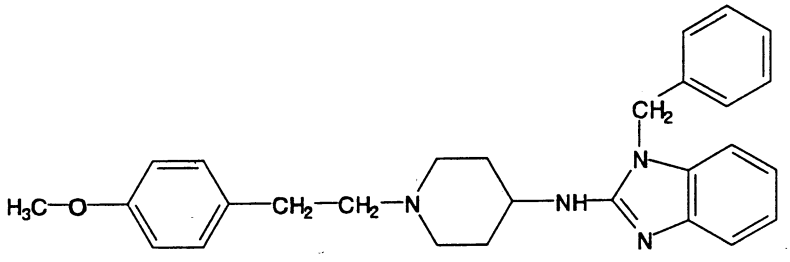
Nečistoty



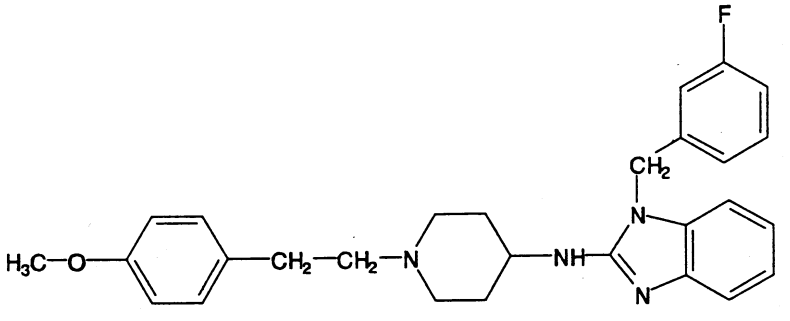
A. 1-[(4-fluorfenyl)methyl]-N-(4-piperidyl)-1*H*-benzimidazol-2-amin,



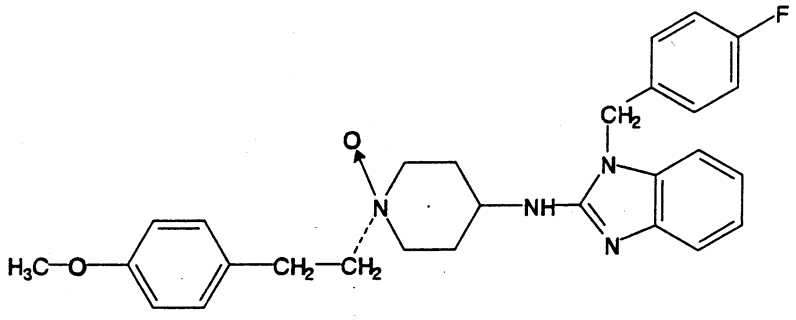
B. 1-[(2-fluorfenyl)methyl]-N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]piperidin-4-yl}-1*H*-benzimidazol-2-amin,



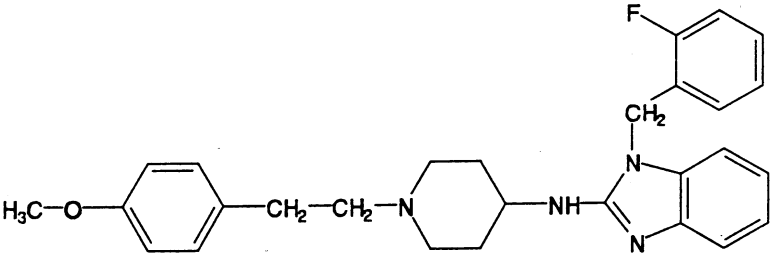
C. N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]piperidin-4-yl}-1-(fenylmethyl)-1*H*-benzimidazol-2-amin,



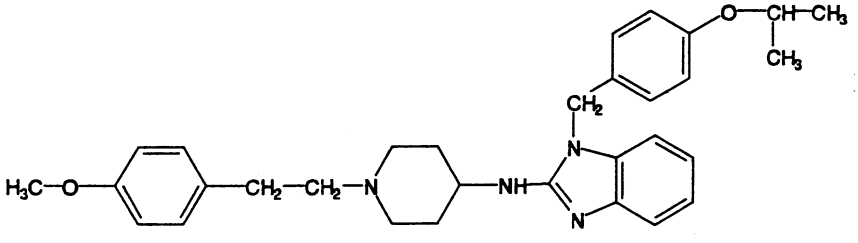
D. 1-[(3-fluorfenyl)methyl]-N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]piperidin-4-yl}-1*H*-benzimidazol-2-amin,



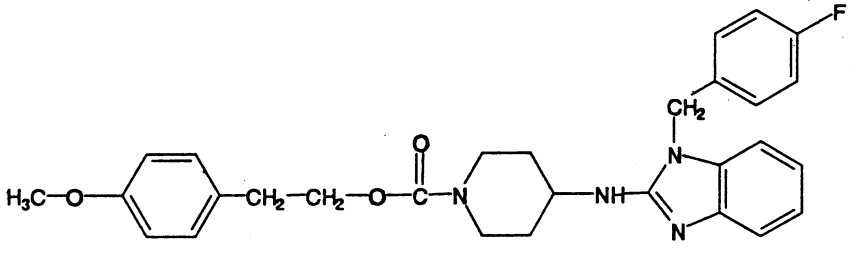
E. N-oxid *cis*-1-[(4-fluorfenyl)methyl]-N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]piperidin-4-yl}-1*H*-benzimidazol-2-aminu,



F. N-oxid*trans*-1-[(4-fluorfenyl)methyl]-N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]piperidin-4-yl}-1*H*-benzimidazol-2-aminu,



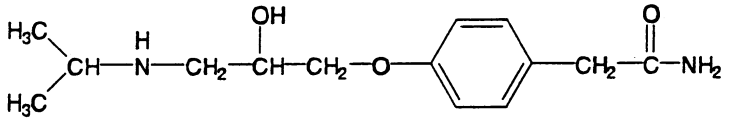
G. N-{1-[2-(4-methoxyfenyl)ethyl]piperidin-4-yl}-1-{[4-(1-methylethoxy)fenyl]methyl}-1*H*--benzimidazol-2-amin,



H. 2-(4-methoxyfenyl)ethyl-4-{[1-(4-fluorfenyl)methyl]-1*H*-benzimidazol-2-yl]amino}-1--piperidinkarboxylat.

† Atenololum

Atenolol



$C_{14}H_{22}N_2O_3$ $_r$ 266,34 CAS 29122-68-7

Je to (*RS*)-4-[2-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)-fenyl]acetamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{22}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 152 C až 155 C.

B. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maxima při 275 nm a při 282 nm. Poměr absorbance při 275 nm k absorbanci při 282 nm je 1,15 až 1,20.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *atenololu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok. 10 mg *atenololu CRL* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R* a *methanolu R* (1 + 99) po dráze 15 cm. Potom se vrstva vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světlem při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než stupeň 6 porovnávacího barevného roztoku nejvhodnější barvy *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost (*2.2.7*). +0,10 až -0,10 ; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí ve 20 ml mobilní fáze a zředí se jí na 25,0 ml.

Zkoušený roztok (b). 50,0 mg se rozpustí v 0,1 ml *dimethylsulfoxidu R*, je-li třeba, mírně se zahřeje ponořením nádobky na několik sekund do vodní lázně a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 50,0 mg *atenololu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí v 0,1 ml *dimethylsufoxidu R*, je-li třeba, mírně se zahřeje ponořením nádobky na několik sekund do vodní lázně a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min připravené následovně: 1,0 g *oktansulfonanu sodného R* a 0,4 g *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* se rozpustí v 1 litru směsi objemových dílů *tetrahydrofuranu R*, *methanolu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (3,4 g/l) (20 + 180 + 800); hodnota pH se upraví *kyselinou fosforečnou R* na 3,0,
- spektrofotometrického detektoru, 226 nm.

Kolona se ustaluje 30 min promýváním mobilní fází s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a) a citlivost systému se upraví tak, aby výška hlavního píku na získaném chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b). Výsledný záznam odpovídá vzorovému chromatogramu *atenololu pro způsobilost systému CRL*, na kterém pík bis-etheru předchází a je oddělen od píku terciárního aminu, který se objeví jako zdvojený pík. Jestliže je to potřeba, upraví se složení mobilní fáze. Zvýšením koncentrace oktansulfonanu sodného se zvyšuje retenční čas terciárního aminu.

Nastříkne se odděleně po 10 µl zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 4násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Pokud je ve zkoušené látce nalezený obsah bisetheru vyšší než 0,15 %, její vhodnost se ověří opakováním chromatografie s 10 µl zkoušeného roztoku (a).

Chloridy *(2.4.4)*. 50 mg se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 15 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %), bez dalšího přidání *kyseliny dusičné zředěné RS*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 80 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,63 mg $C_{14}H_{22}N_2O_3$.

Uchovávání

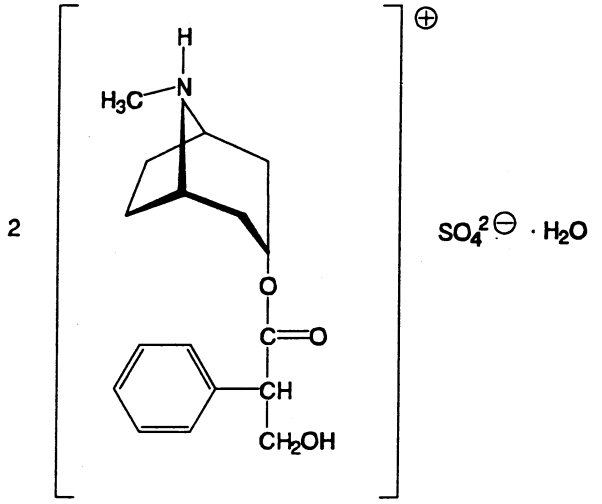
Separandum.

Nečistoty

A. 2-(4-hydroxyfenyl)acetamid,
B. 2-[4-(2,3-dihydroxypropoxy)fenyl]acetamid,
C. 2-[4-(2,3-epoxypropoxy)fenyl]acetamid,
D. 2-[4-(2-hydroxy-3-chlorpropoxy)fenyl]acetamid,
E. 4,4′-(2-hydroxypropan-1,3-diyldioxy)bis(fenylacetamid),
F. 4,4′-[N-isopropyl-3,3′-iminobis(2-hydroxypropoxy)]bis(fenylacetamid),
G. kyselina 2-[4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)fenyl]octová,
H. 2-[4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)fenyl]acetonitril.

†† Atropini sulfas

Atropiniumsulfat



$C_{34}H_{48}N_2O_{10}S \cdot H_2O$ M_r 694,84 CAS 5908-99-6

M_r bezvodého 676,82

Je to monohydrát bis[3 -(*RS*)-tropoyloxy-1 *H*,5 *H*-tropanium]sulfatu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 190 °C, za rozkladu. Stanoví se s látkou sušenou 15 min při 135 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *atropiniumsulfatu CRL*.

C. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 5 ml *trinitrofenolu RS*. Sraženina promytá *vodou R* a sušená při 100 °C až 105 °C po dobu 2 h taje (*2.2.14*) při 174 °C až 179 °C.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*, přidá se 0,1 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R*; vznikne fialové zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce na sírany *(2.3.1)*.

F. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,2; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,6 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 30 ml.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,50° až +0,05°; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě R* a zředěný *vodou R* na 25,0 ml ve 2dm trubici.

Cizí alkaloidy a rozkladné produkty. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, *vody R* a *amoniaku 26% R* (90 + 7 + 3) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C a po ochlazení se vrstva stříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* do vzniku skvrn. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Apoatropin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 245 nm. Specifická absorbance v maximu není větší než 4,0, počítáno na bezvodou látku (asi 0,5 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 2,0 % až 4,0 %, stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a po ochlazení se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 67,68 mg $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

Aurantii dulce pericarpium

N

Sladké oplodí pomeranče

Synonymum. Pericarpium aurantii dulce

Je to usušené oplodí zralých plodů druhu *Citrus aurantium* L. *subsp. aurantium*.
Obsahuje nejméně 10 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga aromatického pachu, nahořklé chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kusy oválné, na koncích zašpičatělé, 5 cm až 8 cm dlouhé, 3 cm až 5 cm široké a asi 1,5 mm silné, rozmanitě zprohýbané. Svrchní strana žlutohnědá až červenohnědá, hrubě dolíčkovaná; vnitřní strana nažloutlá, hladká.7

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je načervenale žlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s buňkami mnohohrannými, ztlustlými, krytými silnou kutikulou, zřídka anomocytické průduchy (*2.8.3*); úlomky hvězdicovitého parenchymu z vnitřní části oplodí; zřídka šroubovitě nebo síťovitě ztlustlé cévy, provázené komůrkovými vlákny; siličné nádržky o průměru až 1000 μm, nebo jejich části; krystaly šťavelanu vápenatého a nepravidelné sférity.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C.
Porovnávací roztok. 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R*, 1,0 mg *kyseliny kávové R*, 2,5 mg *rutinu R* a 2,5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 30 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *2-butanonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku, nad ní je intenzivní červená skvrna (eriocitrin) a nad ní nazelenalá skvrna (hesperidin). V poloze vymezené skvrnami kyseliny chlorogenové a hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku je intenzivní tmavomodrá skvrna. V blízkosti čela chromatogramu jsou čtyři intenzivní světle modré skvrny, z nichž horní odpovídá přibližně polohou skvrně kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další nažloutlé, nazelenalé nebo namodralé skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1 % a nejvýše 10 % částí oplodí silnějších než 2 mm.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 11,0 %. 2,000 g práškované drogy (710) se suší 2 h v sušárně při 100 C až 105 C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 4,0 %.

Stanovení obsahu

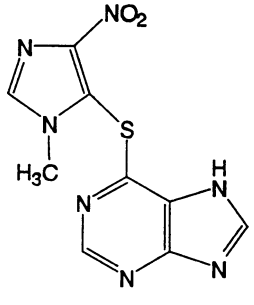
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 20,0 g čerstvě upráškované drogy (710) se destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce se 200 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R*.

Uchovávání

Ve dobře uzavřených obalech, chráněno před světlem.

† Azathioprinum

Azathioprin



$C_9H_7N_7O_2S$ M_r 277,26 CAS 446-86-6

Je to 6-[(1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazol-5-yl)thio]-1*H*-purin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_7N_7O_2S$.

Vlastnosti

Slabě žlutý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%. Je dobře rozpustný ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a mírně rozpustný ve zředěných roztocích minerálních kyselin.

Zkoušky totožnosti

A. 0,150 g se rozpustí ve 30 ml *dimethylsulfoxidu R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 500,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 1000,0 ml. Tento roztok měřený v rozmezí 230 nm až 350 nm *(2.2.25)* vykazuje absorpční maximum při 280 nm. Specifická absorbance v maximu je 600 až 660.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *azathioprinu CRL*.

C. K asi 20 mg se přidá 100 ml *vody R*, směs se zahřeje a zfiltruje. K 5 ml filtrátu se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, asi 10 mg *zinku práškového R* a nechá se 5 min stát; vznikne žluté zbarvení roztoku. Směs se zfiltruje, ochladí se v ledové lázni, přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS*, 0,1 g *kyseliny amidosírové R* a třepe se, dokud se neodstraní bublinky. Potom se přidá 1 ml *2-naftolu RS*; vznikne světle růžová sraženina.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 0,5 g se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, směs se 15 min třepe a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Chlormethylnitroimidazol a merkaptopurin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii* F_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *amoniaku zředěném RS1* a zředí se jím na 10 ml. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *chlormethylnitroimidazolu CRL* se rozpustí v *amoniaku zředěném RS1* a zředí se jím na 50 ml. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *merkaptopurinu R* se rozpustí v *amoniaku zředěném RS1* a zředí se jím na 50 ml. Připraví se těsně před použitím.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se *1-butanolem R* nasyceným *amoniakem zředěným RS1* po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 50 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádné skvrny odpovídající skvrnám chlormethylnitroimidazolu a merkaptopurinu nejsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; suší se 0,50 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 25 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

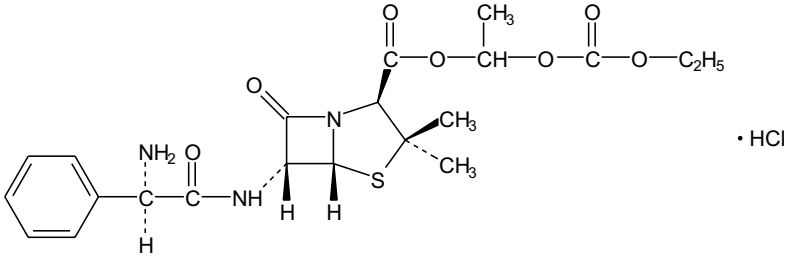
1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,73 mg $C_9H_7N_7O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Bacampicillini hydrochloridum

Bakampiciliniumchlorid



$C_{21}H_{28}ClN_3O_7S$ M_r 501,98 CAS 37661-08-8

Je to hydrochlorid směsi (1*R*) a (1*S*)-1-[(ethoxykarbonyl)oxy]ethylesterů kyseliny (6*R*)-6-(2-amino-2-phenylacetamido)penicilanové. Počítáno na bezvodou a rozpouštědla prostou látku, obsahuje 95,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{28}ClN_3O_7S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek nebo granulát. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *bakampiciliniumchloridu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 10 mg zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (a). 10 mg *bakampiciliniumchloridu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (b). 10 mg *bakampiciliniumchloridu CRL*, 10 mg *talampiciliniumchloridu CRL* a 10 mg *pivampicilinu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů roztoku *octanu sodného R* (272 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou ledovou R* na 5,0, *vody R* a *lihu 96%* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší proudem teplého vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min při 60 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny tři oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a 15 mm v průměru, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS.* Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavožluté zbarvení.

D. Asi 25 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a protřepe se. Po několika minutách se přidají 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1*; vzniká bílá sraženina, která se rozpustí po přidání 0,5 ml *amoniaku 26% RS*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,200 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*; roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*). 0,500 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Absorbance (*2.2.25*) roztoku měřená při 430 nm není větší než 0,10.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 4,5. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +175° až +195°, počítáno na bezvodou látku prostou rozpouštědla. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *N,N-diethylanilinu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *N,N-diethylanilinu R* se rozpustí ve 4,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. Ve zkumavce s kulatým dnem a se zabroušenou zátkou se rozpustí 0,500 g zkoušené látky ve 30,0 ml *vody R*. Přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Roztok se zahřeje na 26 °C až 28 °C. Přidá se 1,0 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a míchá se do úplného rozpuštění. Přidají se 2,0 ml *trimethylpentanu R*. Třepe se 2 min a nechají se oddělit vrstvy. Použije se horní vrstva.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *dimethylanilinu R* se rozpustí ve 4,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml a dále se 1,0 ml roztoku zředí 30,0 ml *vody R*. Přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a 1,0 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. Přidají se 2,0 ml *trimethylpentanu R*. Třepe se 2 min a nechají se oddělit vrstvy. Použije se horní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony z křemenného skla délky 25 m a vnitřního průměru 0,32 mm pokryté na vnitřní stěně 5 % *polydifenyldimethylsiloxanu R* (tloušťka filmu 0,52 µm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu, rozdělovací poměr 1 : 20, vstupní tlak 50 kPa, při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- vstřikovací trubičky asi 1 cm dlouhé naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 10% roztokem *polydimethylsiloxanu R*.

Teplota kolony se po 5 min udržuje na 150 °C, poté se zvyšuje rychlostí 20 °C/min na 275 °C, při níž se udržuje 3 min. Teplota detektoru je 300 °C, teplota nástřikového prostoru 220 °C. Retenční časy jsou: dimethylanilinu asi 3,6 min, diethylanilinu asi 5,0 min.

Nastříkne se šestkrát po 1 µl porovnávacího roztoku. Relativní směrodatná odchylka poměru plochy píků dimethylanilinu a vnitřního standardu není vyšší než 2 %.

Nastřikne se 1 µl zkoušeného roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím dimethylanilinu a nejblíže položeným píkem rozkladného produktu bakampicilinu není alespoň 1,5.

Vypočítá se obsah dimethylanilinu ve zkoušené látce.

Jiná organická rozpouštědla. Celkový obsah je nejvýše 50,0 ml/kg a nejvýše 20,0 ml/kg butylacetatu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *propylacetatu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 ml *propylacetatu R* se zředí *vodou R* na 100 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se dále zředí *vodou R* na 500,0 ml.
Zkoušený roztok. 0,200 g zkoušené látky se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml *ethylacetatu R* se zředí roztokem vnitřního standardu na 100,0 ml. 1,0 ml *butylacetatu R* se zředí roztokem vnitřního standardu na 200,0 ml. Smíchá se 10,0 ml roztoku ethylacetatu a 2,0 ml roztoku butylacetatu a zředí se roztokem vnitřního standardu na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony z křemenného skla délky 25 m a vnitřního průměru 0,32 mm pokryté na vnitřní stěně 5 % *polydifenylmethylsiloxanu R* (tloušťka vrstvy 0,52 µm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu, rozdělovací poměr 1 : 25, vstupní tlak 35 kPa, při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- vstřikovací trubičky asi 1 cm dlouhé naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10% roztokem *polydimethylsiloxanu R*.

Teplota kolony se po 4 min udržuje na 40 °C, pak se zvyšuje rychlostí 10 °C/min na 100 °C, při níž se udržuje 1 min. Teplota detektoru je 300 °C a teplota nástřikového prostoru 200 °C. Retenční časy jsou: ethylacetatu asi 4,2 min, propylacetatu asi 6,5 min, butylacetatu asi 9,1 min.

Nastříkne se šestkrát po 1 µl porovnávacího roztoku. Relativní směrodatné odchylky poměrů ploch píků ethylacetatu ku vnitřnímu standardu a butylacetatu ku vnitřnímu standardu nejsou vyšší než 2 %.

Nastříkne se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Vypočítá se obsah butylacetatu ve zkoušené látce.

Vypočítá se obsah jiných rozpouštědel, vztažený na ethylacetat, ve zkoušené látce.

Rozkladné produkty. Nejvýše 3,0 %. 0,175 g se rozpustí v 25 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a ihned se titruje *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) s použitím srovnávací merkurosulfatové elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody.

Obsah rozkladných produktů (*D*) vyjádřený jako $C_{21}H_{28}ClN_3O_7S$ se v procentech vypočítá ze vzorce:

$$\frac{1{,}004n}{m},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,8 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,5 %. Stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 65,0 mg se přidá 10,0 ml *vody R* a 0,2 ml *acetanhydridu R* a 3 min se míchá. Přidá se 10,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a nechá se 20 min stát. Poté se přidá 10,0 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l RS*, 20 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a ihned se titruje *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) s použitím srovnávací merkurosulfatové elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody. Nebere se v úvahu žádná předběžná inflexe na titrační křivce.

Obsah $C_{21}H_{28}ClN_3O_7S$ se v procentech vypočítá ze vzorce:

$$\frac{1{,}004 n_1}{m_1} - D,$$

v němž značí:
m_1 - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
D - obsah rozkladných produktů v procentech, viz Zkoušky na čistotu.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C.
Separandum.

† Bacitracinum

Bacitracin

CAS 1405-87-4

Bacitracin obsahuje jeden nebo více protimikrobních polypeptidů produkovaných určitými kmeny mikroorganismů *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis* var. *Tracy*. Hydrolýzou vznikají následující aminokyseliny: L-cystein, kyselina D-glutamová, L-histidin, L-isoleucin, L-leucin, L-lysin, D-ornithin, D-fenylalanin a kyselina DL-asparagová.

Počítáno na vysušenou látku, účinnost je nejméně 60 m.j. v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí ve směsi 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,5 ml *vody R*. Zahřívá se 5 h v utěsněné zkumavce při 135 °C, odpaří se do sucha na vodní lázni a pokračuje se v zahřívání do vymizení pachu chlorovodíku. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *vody R*.

Porovnávací roztok. Připraví se stejně jako zkoušený roztok s 5 mg *zinečnatého komplexu bacitracinu CRL*.

Další postup zkoušky se provádí za ochrany před světlem.

Na vrstvu se nanesou odděleně 10mm proužky s 5 µl každého roztoku. V chromatografické komoře se deska umístí tak, aby nepřišla do styku s mobilní fází skládající se ze směsi 25 dílů *vody R* a 75 dílů *fenolu R*. Vrstva se impregnuje parami mobilní fáze nejméně 12 h a vyvíjí se toutéž mobilní fází po dráze 12 cm. Usuší se při 100 °C až 105 °C a postříká se *ninhydrinem RS1*. Pak se 5 min zahřívá při 110 °C. Skvrny ve tvaru pruhů na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 5 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R* a přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Protřepe se a přidá se 0,5 ml roztoku *síranu měďnatého R* (10 g/l); vzniká fialové zbarvení.

C. 0,2 g se žíhá. Zůstane nepatrný zbytek, který není za vysoké teploty žlutý. Nechá se vychladnout a rozpustí se v 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Přidá se 5 ml *vody R* a 0,2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*; nevznikne bílá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok $HŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 7,0; měří se roztok S.

Bacitracin F a příbuzné látky. 0,15 g se rozpustí v *kyselině sírové 0,05 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí na 10,0 ml *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS*. Poměr absorbance (*2.2.25*) při 290 nm k absorbanci při 252 nm není větší než 0,20.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %. 1,000 g se suší 3 h při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřekračujícím 0,1 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě očních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení obsahu

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití *zinečnatého komplexu bacitracinu CRL* jako referenční látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech při teplotě 8 °C až 15 °C. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve vzduchotěsných sterilních zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka sterilní.

† Bacitracinum zincicum

Zinečnatý komplex bacitracinu

Synonymum. Bacitracinum zincum

CAS 1405-89-6

Zinečnatý komplex bacitracinu obsahuje jeden nebo více protimikrobních polypeptidů produkovaných určitými kmeny mikroorganismů *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis* var. *Tracy*. Hydrolýzou vznikají následující aminokyseliny: L-cystein, kyselina D-glutamová, L-histidin, L-isoleucin, L-leucin, L-lysin, D-ornithin, D-fenylalanin a kyselina DL-asparagová.

Počítáno na vysušenou látku, účinnost je nejméně 60 m.j. v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutošedý hygroskopický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí ve směsi 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,5 ml *vody R*. Zahřívá se 5 h v utěsněné zkumavce při 135 °C, odpaří se do sucha na vodní lázni a pokračuje se v zahřívání do vymizení pachu chlorovodíku. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *vody R*.

Porovnávací roztok. Připraví se stejně jako zkoušený roztok s 5 mg *zinečnatého komplexu bacitracinu CRL*.

Další postup zkoušky se provádí za ochrany před světlem.

Na vrstvu se nanesou odděleně 10mm proužky s 5 µl každého roztoku. V chromatografické komoře se deska umístí tak, aby nepřišla do styku s mobilní fází složenou ze směsi 25 dílů *vody R* a 75 dílů *fenolu R*. Vrstva se impregnuje nejméně 12 h parami mobilní fáze a vyvíjí se toutéž mobilní fází po dráze 12 cm. Usuší se při 100 °C až 105 °C a postříká se *ninhydrinem RS1*. Pak se 5 min zahřívá při 110 °C. Skvrny ve tvaru pruhů na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 5 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R* a přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Protřepe se a přidá se 0,5 ml roztoku *síranu měďnatého R* (10 g/l); vzniká fialové zbarvení.

C. Asi 0,15 g látky vyžíhá, nechá se vychladnout a zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Přidají se 4 ml *vody R*; roztok vyhovuje zkoušce na zinek (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 7,5; měří se následující roztok: 1,0 g se asi 1 min protřepává s 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se.

Bacitracin F a příbuzné látky. 0,15 g se rozpustí v *kyselině sírové 0,05 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí na 10,0 ml *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS*. Poměr absorbance (*2.2.25*) při 290 nm k absorbanci při 252 nm není větší než 0,15.

Obsah zinku. 4,0 % až 6,0 %, počítáno na vysušenou látku. 0,200 g se rozpustí ve směsi 2,5 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml *vody R*. Přidá se 50 ml *vody R*, 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* a dostatečné množství *methenaminu R*, aby vzniklo červené zbarvení. Přidají se 2 g *methenaminu R* a titruje se *edetanem disodným 0,01 mol/l VS* do vzniku žlutého zbarvení.

1 ml *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* odpovídá 0,654 mg zinku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %. 1,000 g se suší 3 h při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřekračujícím 0,1 kPa.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě přípravků určených k rozprašování do tělních dutin bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě přípravků určených k rozprašování do tělních dutin bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml supernatantní tekutiny získané odstřeďováním suspenze obsahující 11 mg zkoušené látky v 1 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

Stanovení účinnosti

50,0 mg se protřepává s 5 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Ponechá se 30 min stát. Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

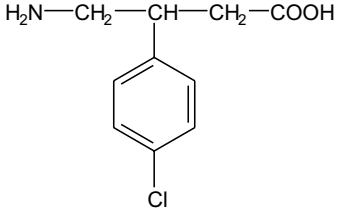
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

† Baclofenum

Baklofen



$C_{10}H_{12}ClNO_2$ M_r 213,66 CAS 1134-47-0

Je to kyselina (*RS*)-4-amino-3-(4-chlorfenyl)máselná. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{12}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 70 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 320 nm; roztok vykazuje absorpční maxima při 259 nm, 266 nm a 275 nm. Specifická absorbance maxima při 259 nm je 9,8 až 10,8, při 266 nm je 11,5 až 12,7 a při 275 nm je 8,4 až 9,3. Zkoušku lze hodnotit, jestliže při zkoušce na rozlišení (*2.2.25*) není poměr absorbancí menší než 1,5.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety připravené ze 3 mg zkoušené látky a 300 mg *bromidu draselného R* se shoduje se spektrem *baklofenu CRL*. Jestliže spektra zkoušené látky a referenční látky nejsou shodná, rozpustí se odděleně 0,1 g zkoušené látky a *baklofenu CRL* v 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidá se 10 ml *lihu 96% R*, 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a nechá se 1 h stát. Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje se *lihem 96% R*, vysuší se ve vakuu, připraví se nové tablety a znovu se zaznamenají spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v mobilní fázi, viz níže, a zředí se stejným rozpouštědlem na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *baklofenu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R, methanolu R, chloroformu R* a *ethylacetatu R* (5 + + 5 + 20 + 30 + 40) po dráze 12 cm. Po odpaření rozpouštědel se vrstva postříká *ninhydrinem RS3* tak, aby vrstva byla slabě vlhká. Potom se vrstva vysuší v sušárně při 100 °C a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředí se jím na 25 ml. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *baklofenu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,0 ml zkoušeného roztoku se zředí na 100,0 ml mobilní fází.
Porovnávací roztok (d). 2,0 ml zkoušeného roztoku a 2,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2,0 ml/min, která se připraví takto: 1,822 g *hexansulfonanu sodného R* se rozpustí v 1 l směsi objemových dílů *vody R, methanolu R* a *kyseliny octové ledové R* (560 + 440 + 5),
- spektrofotometrického detektoru, 266 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (c) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (d). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky baklofenu a baklofenu nečistoty A je nejméně 2,0. Nastříkne se jednotlivě po 20 μl zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c). Zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku baklofenu nečistoty A větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,0 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

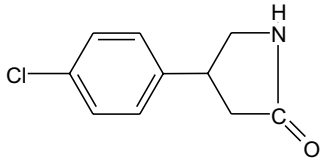
0,1500 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,37 mg $C_{10}H_{12}ClNO_2$.

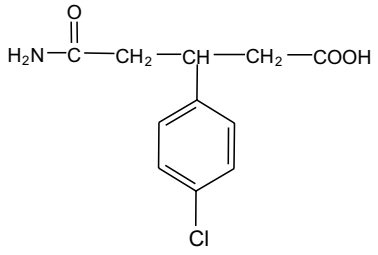
Uchovávání

Separandum.

Nečistoty



A. (*RS*)-3-(4-chlorfenyl)-4-butanlaktam,



B. monoamid kyseliny 3-(4-chlorfenyl)glutarové.

Balsamum peruvianum

Peruánský balzám

Je to balzám získaný z popáleného a poraněného kmene druhu *Myroxylon balsamum* (L.) HARMS var. *pereirae* (ROYLE) HARMS.

Obsahuje 45,0 % až 70,0 % esterů, zejména benzylbenzoatu a benzylcinnamatu.

Vlastnosti

Tmavě hnědá viskózní tekutina, v tenké vrstvě průhledná, žlutohnědá; není lepivá, nevysychá ani se niťovitě netáhne.

Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu, nemísitelný s mastnými oleji s výjimkou ricinového oleje.

Zkoušky totožnosti

A. 0,20 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*. Přidají se 0,2 ml *chloridu železitého RS1*; vzniká zelené až olivově zelené zbarvení.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,5 g zkoušené látky se rozpustí v 10 ml *ethylacetatu R*.

Porovnávací roztok. 4 mg *thymolu R*, 30 mg *benzylcinnamatu R* a 80 μl *benzylbenzoatu R* se rozpustí v 5 ml *ethylacetatu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se dvakrát směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethylacetatu R* a *hexanu R* (0,5 + 10 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm, skvrny se označí. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v horní třetině patrny dvě skvrny, z nichž horní odpovídá benzylbenzoatu a spodní benzylcinnamatu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny odpovídající polohou a intenzitou zbarvení skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Skvrny na žlutém pozadí odpovídající benzylbenzoatu a benzylcinnamatu jsou zbarveny modře. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je přibližně uprostřed fialovošedá skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná modrá skvrna (nerolidol) těsně pod skvrnou odpovídající thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Pod skvrnou odpovídající nerolidolu není žádná modrá skvrna zhášející fluorescenci v ultrafialovém světle při 254 nm (kalafuna). V horní a dolní části chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, slabě modře zbarvené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota (*2.2.5*). 1,14 až 1,17.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 230 až 255; stanoví se ze zbytku získaného ve zkoušce Stanovení obsahu.

Umělé balzámy. 0,20 g se protřepe se 6 ml *etheru petrolejového R1*. Roztok je čirý a bezbarvý, všechny nerozpustné části balzámu ulpívají na stěnách zkumavky.

Mastné oleje. 1 g se protřepává se 3 ml roztoku *chloralhydrátu R* (1000 g/l). Roztok je čirý tak jako roztok *chloralhydrátu R* (1000 g/l).

Terpentýn. 4 ml roztoku ze zkoušky Umělé balzámy se odpaří do sucha. Odparek nepáchne po terpentýnu.

Stanovení obsahu

K 2,50 g v dělicí nálevce se přidá 7,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 40 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a protřepává se intenzivně 10 min. Spodní vrstva se oddělí a protřepává se třikrát 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Spojené etherové výtřepky se vysuší 10 g *síranu sodného bezvodého R* a zfiltrují se. Síran sodný se promyje dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Spojené etherové vrstvy se odpaří do sucha. Zbytek (estery) se suší 30 min při 100 °C až 105 °C a pak se zváží.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Balsamum tolutanum

N

Toluánský balzám

CAS 9000-64-0

Je to balzám získaný nařezáváním kůry stromů druhu *Myroxylon balsamum* (L.) HARMS var. *genuinum* BAILL.

Obsahuje 35,0 % až 50,0 % volných nebo vázaných balzámových kyselin, počítáno jako kyselina skořicová ($C_9H_8O_2$; M_r 148,15), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Polotuhá hnědožlutá až červenohnědá hmota, charakteristického pachu po vanilinu. Delším skladováním se mění v tvrdou hmotu, roztíratelnou na žlutý až hnědavě žlutý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v etheru petrolejovém.

Měkne při teplotě asi 30 °C.

Taje při teplotě asi 60 °C.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se smíchá se 2 ml *manganistanu draselného RS* a vaří se 1 min; vznikne charakteristický pach po benzaldehydu.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *chloroformu R*, protřepává se 10 min a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 4 mg *thymolu R*, 30 mg *benzylcinnamatu R* a 80 μl *benzylbenzoatu R* se rozpustí v 5 ml *ethylacetatu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se dvakrát směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethylacetatu R* a *hexanu R* (0,5 + 10 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm; skvrny na chromatogramech se označí. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám benzylbenzoatu a benzylcinnamatu na chromatogramu porovnávacího roztoku; skvrna odpovídající benzylbenzoatu na chromatogramu zkoušeného roztoku je menší a méně intenzivní než skvrna benzylbenzoatu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) *v lihu 96 % R* a suší se 5 min až 120 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám benzylbenzoatu a benzylcinnamatu na chromatogramu porovnávacího roztoku; skvrna odpovídající benzylbenzoatu na chromatogramu zkoušeného roztoku je menší a méně intenzivní než skvrna odpovídající benzylcinnamatu. V poloze odpovídající skvrně thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku nebo těsně pod ní není patrna žádná intenzivní skvrna. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrny další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Podíl nerozpustný v lihu. Nejvýše 5,0 %. 2,00 g práškované drogy (355) se v předem zvážené extrakční patroně extrahuje *lihem R* 90% *(V/V)* v Soxhletově přístroji tak dlouho, až 1 ml odtékajícího extraktu nezanechá po odpaření važitelný zbytek. Pak se extrakční patrona se zbytkem drogy suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 0,10 g.

Číslo kyselosti. 100 až 160. 0,500 g práškované drogy (355) se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* zneutralizovaného po přidání *fenolftaleinu RS*, přidá se 20,0 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l VS* a po 5 min stání 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení. Provede se slepá zkouška. Číslo kyselosti se vypočítá podle vzorce uvedeného ve zkoušce Číslo kyselosti *(2.5.1)*.

Číslo zmýdelnění. 170 až 230. 0,200 g práškované drogy (355) se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* zneutralizovaného po přidání *fenolftaleinu RS*. Přidá se 5,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem za častého protřepávání. Po ochlazení se přidá 20 ml *lihu 96% R*, 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení. Provede se slepá zkouška. Číslo zmýdelnění se vypočítá podle vzorce uvedeného ve zkoušce Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*.

Kalafuna. 1 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *etheru petrolejového R* a zahřívá se 5 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. Filtrát je bezbarvý nebo téměř bezbarvý. Přidá se 5 ml roztoku *octanu měďnatého R* (1 g/l) a protřepává se intenzivně 3 min. Horní vrstva není zbarvena modře ani zeleně.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %. 2,000 g práškované drogy (355) se suší 4 h ve vakuu.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

1,500 g se smíchá s 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem. Líh se odpaří, zbytek se smíchá s 50 ml *vody R* a zahřeje se k varu; po ochlazení se přidá 80 ml *vody R*, 50 ml roztoku *síranu hořečnatého R* (30 g/l) a po 10 min stání se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí čtyřikrát 5 ml *vody R*. Spojené filtráty a promývací tekutiny

se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou R* a protřepávají se čtyřikrát 40 ml *etheru R*. Spodní vrstva se odstraní. Pak se protřepává dvakrát 20 ml a třikrát 10 ml roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* (50 g/l). Horní vrstva se odstraní. Spojené spodní vrstvy se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou R* a protřepávají se 30 ml, dvakrát 20 ml a 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Filtrát se odpaří v proudu vzduchu opatrně do sucha. Zbytek se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *lihu 96% R* neutralizovaného po přidání *červeně fenolové RS*, po ochlazení se přidá 0,1 ml *červeně fenolové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny zbarvení.

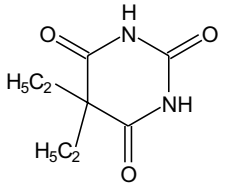
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,82 mg balzámových kyselin, počítáno jako kyselina skořicová ($C_9H_8O_2$).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

§ Barbitalum

Barbital



$C_8H_{12}N_2O_3$ M_r 184,19 CAS 57-44-3

Je to kyselina 5,5-diethylbarbiturová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{12}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve vroucí vodě, v lihu 96% a v etheru. S hydroxidy, s alkalickými uhličitany a s amoniakem tvoří ve vodě rozpustné sloučeniny.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Stanoví se teplota tání *(2.2.14)*. Smíchají se stejné díly zkoušené látky a *barbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Stanovené teploty tání, které jsou asi 190 °C, se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *barbitalu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 75 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok. 75 mg *barbitalu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 6 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 1,0 g se přidá 50 ml *vody R*, směs se 2 min vaří a po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžově žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a potom se postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R*. Po vysušení na vzduchu se vrstva potříká *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem 96% prostým aldehydů R* (1 : 5), 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a ihned se hodnotí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku hodnocené v ultrafialovém světle při 254 nm a po postřiku detekčním činidlem, kromě hlavní skvrny, nejsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

85,0 mg se rozpustí v 5 ml *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*. Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do čistě modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,21 mg $C_8H_{12}N_2O_3$.

Uchovávání

Psychotropní látka.

Barii sulfas

Síran barnatý

Synonymum. Barium sulfuricum

$BaSO_4$ M_r 233,39 CAS 7727-43-7

Vlastnosti

Jemný bílý těžký prášek bez hrubších částic. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v organických rozpouštědlech, velmi těžce rozpustný v kyselinách a v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. 0,2 g se 5 min vaří s 5 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (500 g/l), přidá se 10 ml *vody R* a směs se zfiltruje. Část filtrátu se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*; tento roztok vyhovuje zkoušce na sírany *(2.3.1)*.

B. Zbytek ze zkoušky A se třikrát promyje malým množstvím *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,3 ml *kyseliny sírové zředěné RS*; vznikne bílá sraženina nerozpustná v *hydroxidu sodném zředěném RS*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 20,0 g se přidá 40 ml *vody R* a 60 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Směs se 5 min vaří, zfiltruje se a ochlazený filtrát se zředí *vodou R* na 100 ml.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se 5 min zahřívá na vodní lázni s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *modři bromthymolové RS1*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Látky rozpustné v kyselém prostředí. Nejvýše 0,3 %; 25 ml roztoku S se odpaří na vodní lázni a suší se při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti. Zbytek váží nejvýše 15 mg (0,3 %).

Oxidovatelné sirné sloučeniny. 1,0 g se 30 s třepe s 5 ml *vody R*, zfiltruje se a k filtrátu se přidá 0,1 ml *škrobu RS*. V této směsi se rozpustí 0,1 g *jodidu draselného R* a přidá se 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodičnanu draselného R* (3,6 mg/l), 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a dobře se protřepe; zbarvení roztoku je intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem bez přidání roztoku *jodičnanu draselného R* (3,6 mg/l).

Rozpustné soli barnaté. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*; opalescence roztoku do 1 h není intenzivnější než opalescence směsi 10 ml roztoku S a 1 ml *vody R*.

Fosforečnany. Nejvýše 50 μg/g; k 1,0 g se přidá směs 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 7 ml *vody R*. Směs se 5 min zahřívá na vodní lázni, zfiltruje se, filtrát se zředí *vodou R* na 10 ml a přidá se 5 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R*; do 5 min zkoušený roztok není intenzivněji žlutě zbarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku fosforečnanů (5 μg PO_4/ml)*.

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g se v dlouhohrdlé spalovací baňce smíchá s 2 ml *kyseliny dusičné R* a 30 ml *vody R*. Po nasazení malé nálevky se šikmo postavená baňka 2 h zahřívá na vodní lázni. Po ochlazení se obsah baňky doplní *vodou R* na výchozí objem a zfiltruje se. Zbytek se promyje

dekantací třikrát 5 ml *vody R*, filtrát a promývací voda se spojí, přidá se 1 ml *kyseliny sírové R*, směs se odpaří na vodní lázni do sucha a zahřívá se tak dlouho, dokud unikají bílé páry. Zbytek se rozpustí v 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a přidá se 10 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

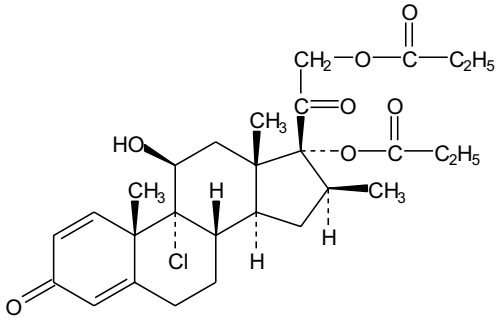
Těžké kovy *(2.4.8)*. 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta žíháním. Nejvýše 2,0 %; žíhá se 1,00 g při 600 °C.

Sedimentace. 5,0 g se převede do odměrného válce na 50 ml se zabroušenou zátkou a se stupnicí, jejíž délka je 14 cm. Přidá se *voda R* na objem 50 ml, směs se 5 min třepe a potom se nechá stát 15 min; sedimentovaný síran barnatý neklesne pod značku 15 ml.

† Beclometasoni dipropionas

Beklomethasondipropionat



$C_{28}H_{37}ClO_7$ M_r 521,05 CAS 5534-09-8

Je to 9-chlor-11β,17,21-trihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-17,21-dipropionat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{28}H_{37}ClO_7$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 210 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *beklomethasondipropionatu CRL*. Jestliže se spektra látek v pevném stavu liší, zaznamenají se spektra roztoků obou látek v *chloroformu R* (50 g/l).

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se použije také k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku připraveného v odstavci Zkoušený roztok (a) se převedou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou zábrusovou nebo polytetrafluoroethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře, zahřívá se 3 h ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem a ochladí se.

Porovnávací roztok (a). 25 mg *beklomethasondipropionatu CRL* se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zkumavky se zabroušenou skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 3 h při 45 °C za ochrany před světlem a ochladí se.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) jsou patrny nejvýše dvě zřetelně oddělené skvrny, které se polohou a velikostí shodují se skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) jsou patrny nejvýše dvě zřetelně oddělené skvrny, které polohou a barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí se shodují se skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou a barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shodují s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

C. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červenohnědé zbarvení. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

D. S 25 mg se provede spalování organických látek v kyslíku *(2.5.10)* za použití směsi 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 20 ml *vody R* k absorpci vzniklých látek. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +88° až +94°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním *dioxanem R* na 25,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml a měří se absorbance v maximu při 238 nm; specifická absorbance v maximu je 284 až 302, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *beklomethason-17-propionatu CRL* a 2 mg *beklomethason-21--propionatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: 600 ml *acetonitrilu R* se smíchá s 350 ml *vody R*, po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm, jehož citlivost byla nastavena tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla 70 % až 90 % stupnice.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a).

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: beklomethason 17-propionatu asi 6,2 min, beklomethason 21-propionatu asi 6,7 min, beklomethason-dipropionatu 13 min až 14 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky beklomethason 17-propionatu a beklomethason 21-propionatu je nejméně 1,4. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu R* v mobilní fázi. Nastříkne se odděleně pětkrát 20 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejvýše 2,0 %.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %) a nejvýše plocha jednoho takového píku je větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %). K píkům rozpouštědla a k píkům s plochou menší než 0,025násobku plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se nepřihlíží.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

V průběhu stanovení se roztoky chrání před světlem. Zbarvené reakční produkty mají snahu se absorbovat na povrch skleněného nádobí. Aby se vyloučilo nacházení nižších výsledků stanovení, doporučuje se, aby toto nádobí bylo před použitím vystaveno působení zmíněných reakčních produktů a bylo vyhrazeno pouze pro toto stanovení. Mezi jednotlivými stanoveními se nádobí umývá pouze vodou R.

Přesná navážka zkoušené látky se rozpustí v *lihu 96% prostém aldehydů R* tak, aby 10,0 ml výsledného roztoku obsahovalo 340 μg až 360 μg zkoušené látky. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok rozpuštěním *beklometasondipropionatu CRL*. Do dvou 25ml odměrných baněk se odděleně převede po 10,0 ml každého roztoku a do třetí odměrné baňky se vpraví 10 ml *lihu 96% prostého aldehydů R* (slepá zkouška). Do každé odměrné baňky se přidají 2,0 ml *trifenyltetrazoliumchloridu RS*, vzduch nad roztokem se vytěsní proudem *dusíku prostého kyslíku R*, rychle se přidají 2,0 ml *tetramethylamoniumhydroxidu zředěného RS* a pokračuje se v zavádění *dusíku prostého kyslíku R*. Baňky se uzavřou, obsah se opatrně promíchá a 2 h se zahřívá ve vodní lázni při 35 °C. Po rychlém ochlazení se roztoky zředí *lihem 96% prostým aldehydů R* a ihned se měří absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v 10mm vrstvě za použití uzavřených kyvet v maximu při 485 nm proti kontrolnímu roztoku získanému při slepé zkoušce. Při stanovení je třeba dodržet, aby doba od přidání *tetramethylamoniumhydroxidu zředěného RS* do měření absorbance byla u obou roztoků stejná.

Vypočítá se obsah $C_{28}H_{37}ClO_7$ z naměřených hodnot absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Belladonnae folium

Rulíkový list

Synonymum. Folium belladonnae

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Atropa belladonna* L. Obsahuje nejméně 0,30 % alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$; M_r 289,36), vztaženo na drogu vysušenou při 100 °C až 105 °C. Alkaloidy tvoří hyoscyamin provázený malým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

Vlastnosti

Droga má slabý pach nutkající ke zvracení.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listy zelené až hnědozelené, na svrchní straně mírně tmavší, často svraskalé, zkroucené a částečně dohromady zmáčknuté. List řapíkatý, na bázi zašpičatělý, sbíhavý, čepel celokrajná. Kvetoucí stonky zploštělé, v každé uzlině s párem listů nestejné velikosti; v paždí listů jednotlivé květy nebo někdy i plody. Květy mají srostloplátečný kalich a zvonkovitou korunu. Plody jsou kulaté zelené bobule s vytrvalým kalichem, se široce odstálými ušty.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je tmavě zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele listu s buňkami pokožky se stěnami zvlněnými a zvrásněnou kutikulou; anizocytické a anomocytické průduchy četnější na spodní straně listu; mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy s hladkou kutikulou; žláznaté chlupy s jednobuněčnou hlavičkou a jednořadou mnohobuněčnou nohou nebo s mnohobuněčnou hlavičkou a jednobuněčnou nohou; okrouhlé parenchymatické buňky s mikro-

krystaly šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. V práškované droze mohou být patrna: vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; téměř kulovitá pylová zrna o průměru 40 μm až 50 μm, se třemi klíčními póry, trikolpátní, s široce tečkovanou exinou; úlomky koruny s papilózní pokožkou, s četnými krycími a žláznatými chlupy výše popsaných typů; úlomky hnědožlutých semen s nepravidelně ztlustlými tečkovanými buňkami osemení.

C. 1 g práškované drogy se smíchá s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a protřepává se 2 min. Pak se zfiltruje, k filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Protřepává se opatrně 15 ml *etheru R* tak, aby nedošlo k tvorbě emulze. Etherová vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*, pak se zfiltruje a ether se na porcelánové misce odpaří. Ke zbytku se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Ke zbytku se přidá 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu 96% R*; vznikne tmavě fialové zbarvení.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografie, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,6 g práškované drogy (180) se smíchá s 15 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a protřepává se 15 min. Pak se zfiltruje a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do získání 20 ml filtrátu. Filtrát se smíchá s 1 ml *amoniaku 26% R* a protřepává se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R,* je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, pak se zfiltrují a odpaří se do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

Porovnávací roztok. 50 mg *hyoscyaminiumsulfatu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolaminiumbromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. Smíchá se 1,8 ml roztoku skopolaminiumbromidu a 8 ml roztoku hyoscyaminiumsulfatu.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl a 20 μl obou roztoků; vzdálenost mezi jednotlivými pruhy je 1 cm. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrny další méně výrazné skvrny; při nanášce 20 μl ve střední části chromatogramu, při nanášce 10 μl v blízkosti startu. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná. Pozoruje se po 15 min. Hnědé skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin), další skvrny již nejsou patrné.

Cizí příměsi *(2.8.2).* Nejvýše 3 % stonků o průměru větším než 5 mm.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 16,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové *(2.8.1)*. Nejvýše 4,0 %.

Stanovení obsahu

Asi 50 g drogy se upráškuje na předepsaný stupeň (180).

Práškovaná droga se použije ke zkouškám Ztráta sušením a Stanovení obsahu.

a) **Ztráta sušením** *(2.2.32)*. 2,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

b) 10,00 g se navlhčí směsí složenou z 5 ml *amoniaku 17,5% RS*, 10 ml *lihu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h stát. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetrajodortuťnatanem draselným RS*. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstředěním. Spojené spodní vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a protřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Pak se chloroform slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l RS* a chloroform se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$), se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{57{,}88\ .\ (20\ -\ n)}{(100\ -\ d)\ .\ m},$$

v němž značí:

d - ztrátu sušením v procentech,

n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech,

m - navážku drogy v gramech.

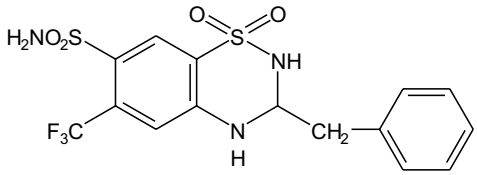
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Separandum.

† Bendroflumethiazidum

Bendroflumethiazid



$C_{15}H_{14}F_3N_3O_4S_2$ M_r 421,41 CAS 73-48-3

Je to (*RS*)-3-benzyl-3,4-dihydro-6-trifluoromethyl-2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-7-sulphonamid-1,1-dioxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{15}H_{14}F_3N_3O_4S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.25)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *bendroflumethiazidu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku s nanáškou 4 μl se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Ve zkumavce se zahřívá 0,5 ml nasyceného roztoku *oxidu chromového R* v *kyselině sírové R* přímo na plameni, dokud unikají bílé dýmy; roztok smáčí stěnu zkumavky a nejeví známky mastnoty. Přidají se asi 2 mg zkoušené látky a znovu se zahřívá přímo na plameni, dokud unikají bílé dýmy; roztok nesmáčí stěnu zkumavky a nelze jej snadno vylít.

D. Asi 5 mg se zahřívá se směsí 5 ml *manganistanu draselného RS* a 1 ml *kyseliny sírové R*. Je cítit pach benzaldehydu.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *bendroflumethiazidu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanesou 4 μl a 20 μl zkoušeného roztoku, 4 μl porovnávacího roztoku (a) a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se *ethylacetatem R* po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min v proudu vzduchu a potom se postříká směsí stejných objemových dílů *kyseliny*

sírové v lihu RS a *lihu 96% R* po malých dávkách tak, aby nedošlo k nadbytečnému zvlhčení vrstvy; použije se asi 10 ml na vrstvu o rozměru 200 mm x 200 mm. Potom se vrstva zahřívá 30 min při 100 °C až 105 °C a ihned se přemístí do skleněné komory nad 10 ml nasyceného roztoku *dusitanu sodného R*, opatrně se k němu přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, komora se uzavře a nechá stát 15 min. Po vyjmutí z komory se vrstva zahřívá 15 min ve větratelné sušárně při 40 °C, postříká se třikrát 5 ml čerstvě připraveného roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l) v *lihu 96% R* a pozoruje se v procházejícím světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku s nanáškou 20 μl, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50 ml *pyridinu bezvodého R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* do druhého inflexního bodu. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,07 mg $C_{15}H_{14}F_3N_3O_4S_2$.

Uchovávání

Separandum.

Bentonitum

Bentonit

CAS 1302-78-9

Je to přírodní zemina obsahující vysoký podíl montmorillonitu, přírodního hydratovaného křemičitanu hlinitého, ve kterém některé atomy hliníku a křemíku mohou být nahrazeny jinými atomy, např. hořčíku nebo železa.

Vlastnosti

Šedobílý s více nebo méně žlutým nebo růžovým odstínem velmi jemný homogenní prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a ve vodných roztocích. Bobtnáním s malým množstvím vody tvoří tvárnou hmotu.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se smíchá v kovovém kelímku s 1 g *dusičnanu draselného R* a 3 g *uhličitanu sodného R* a zahřívá se do roztavení směsi. Po vychladnutí se ke zbytku přidá 20 ml vroucí *vody R*, zamíchá se a zfiltruje. Zbytek se promyje 50 ml *vody R* a přidá se k němu 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 5 ml *vody R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a opět se zfiltruje. K filtrátu se přidají 3 ml *chloridu amonného RS*; vylučuje se bílá rosolovitá sraženina.

B. Zkouška Bobtnavost ve vodě, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. 0,25 g vyhovuje zkoušce na křemičitany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Zásaditě reagující látky. Ke 2 g se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 5 min se třepe. K 5 ml suspenze se přidá 0,1 ml *thymolftaleinu RS*; kapalina zmodrá. Po přidání 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* se kapalina během 5 min odbarví.

Velikost částic. K 20 g se přidá 1000 ml *vody R* a míchá se 15 min vysokorychlostní míchačkou při rychlosti alespoň 5000 ot/min. Suspenze se proleje navlhčeným sítem (75), které se po sušení při 100 °C až 105 °C zváží, promyje se třikrát 500 ml *vody R*, při čemž je třeba zajistit, aby se shluky částic rozptýlily, pak se znovu suší při 100 °C až 105 °C a opět se zváží. Částice na sítu váží nejvýše 0,1 g (0,5 %).

Sedimentační objem. K 6,0 g se přidá 200 ml *vody R* a míchá se 20 min vysokorychlostní míchačkou při rychlost 10 000 ot/min. 100 ml suspenze se přeleje do odměrného válce a nechá se 24 h stát. Objem čiré supernatantní tekutiny je nejvýše 2 ml.

Bobtnavost ve vodě. 2,0 g se ve dvaceti dávkách po 2 min vsypou do 100ml odměrného válce o průměru asi 30 mm obsahujícího 100 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (10 g/l). Zjevný objem sedimentu do 2 hod je nejméně 22 ml.

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 5,0 g se přidá 7,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 27,5 ml *vody R* a vaří se 5 min. Suspenze se odstřeďuje, supernatantní tekutina se zfiltruje, zbytek po odstřeďování se promyje *vodou R* a zfiltruje se. Spojené filtráty se zředí *vodou R* na 50,0 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 25 ml *isobutylmethylketonu R* a 2 min se protřepává. Vrstvy se oddělí a vodná vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni. Zbytek po odpaření se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R*, zředí se *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. 12 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 15 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Benzalkonii chloridi solutio

Roztok benzalkoniumchloridu

Je to vodný roztok směsi alkylbenzyldimethylamoniumchloridů, jejichž alkylové skupiny mají délku řetězců C_8 až C_{18} . Obsahuje 475 g/l až 525 g/l alkylbenzyldimethylamoniumchloridů počítaných jako $C_{22}H_{40}ClN$ (M_r 354,02). Roztok může obsahovat líh.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá tekutina, mísitelná s vodou a lihem 96%. Při třepání silně pění.

Zkoušky totožnosti

A. 0,3 ml se zředí *vodou R* na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v rozmezí při 220 nm až 350 nm. Absorpční maxima roztoku jsou při 257 nm, 263 nm a 269 nm a prodleva je při asi 250 nm.

B. K 0,05 ml se přidají 2 ml *vody R*, 0,1 ml *kyseliny octové ledové R* a po kapkách 1 ml *tetrafenylboritanu sodného RS*; vznikne bílá sraženina. Směs se zfiltruje a sraženina se rozpustí ve směsi 1 ml *acetonu R* a 5 ml *lihu 96% R* zahřátím nejvýše na 70 °C. K teplému roztoku se po kapkách přidává *voda R*, až se vytvoří slabá opalescence. Potom se znovu opatrně zahřívá do vyjasnění roztoku a nechá se ochladit. Vzniknou bílé krystaly, které se odfiltrují, promyjí třikrát 10 ml *vody R* a usuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* nebo *silikagelem bezvodým R* při teplotě nepřevyšující 50 °C; krystaly tají *(2.2.14)* při 127 °C až 133 °C.

C. K 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se přidá 0,1 ml *modři bromfenolové RS1*, 5 ml *chloroformu R* a protřepe se. Chloroformová vrstva je bezbarvá. Přidá se 0,05 ml zkoušeného roztoku a protřepe se; vznikne modré zbarvení chloroformové vrstvy.

D. K 0,05 ml se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Vznikne bílá sraženina, která se po přidání 5 ml *lihu 96% R* rozpustí. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Aminy a amonné soli. 10,0 g se zahřátím smíchá s 20 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (3 + 97) a přidá se 100 ml *2-propanolu R*. Roztok se nechá pomalu probublávat proudem *dusíku R*. Postupně se přidá 12,0 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* a zaznamená se potenciometricky *(2.2.20)* titrační křivka. Vykazuje-li titrační křivka dva inflexní body, objem titračního roztoku přidaný mezi těmito body není větší než 5,0 ml. Nevykazuje-li titrační křivka žádný inflexní bod, zkoušený roztok nevyhovuje této zkoušce. Vykazuje-li titrační křivka jeden inflexní bod, opakuje se zkouška, ale před titrací se přidají 3,0 ml roztoku *dimethyltetradecylaminu R* (25 g/l) v *2-propanolu R*. Vykazuje-li titrační křivka po přidání 12,0 ml stejného titračního činidla pouze jeden inflexní bod, zkoušená látka nevyhovuje této zkoušce.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se hustota *(2.2.5)* zkoušeného roztoku. 4,000 g se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se přenese do dělicí nálevky, přidá se 25 ml *chloroformu R*, 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l). Dobře se protřepe, nechají se oddělit vrstvy a chloroformová vrstva se odstraní. Vodná vrstva se protřepe třikrát 10 ml *chloroformu R* a chloroformové vrstvy se odstraní. K vodné vrstvě se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, nechá se ochladit a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS*, pokud se tmavě hnědý roztok prakticky neodbarví. Potom se přidají 2 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za intenzivního třepání, dokud se barva chloroformové vrstvy již dále nemění. Současně se provede slepá zkouška se směsí 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l), 20 ml *vody R* a 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*.

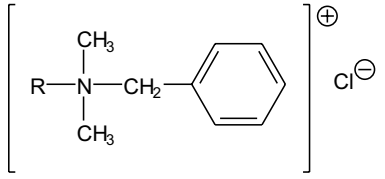
1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 35,40 mg $C_{22}H_{40}ClN$.

Označování

V označení na obalu se uvede obsah lihu, pokud je v přípravku přítomen.

Benzalkonii chloridum

Benzalkoniumchlorid



R = C_8H_{17} až $C_{18}H_{37}$ CAS 8001-54-5

Je to směs alkylbenzyldimethylamoniumchloridů, jejichž alkylové skupiny mají délky řetězců C_8 až C_{18}. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 104,0 % alkylbenzyldimethylamoniumchloridů počítaných jako $C_{22}H_{40}ClN$ (M_r 354,02).

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek nebo nažloutlé želatinové kousky, hygroskopické, na dotyk mazlavé. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%. Při zahřívání se tvoří čirá mazlavá hmota. Vodný roztok při třepání silně pění.

Zkoušky totožnosti

A. 80 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v rozmezí při 220 nm až 350 nm. Absorpční maxima roztoku jsou při 257 nm, 263 nm a 269 nm a prodleva je při asi 250 nm.

B. Ke 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *kyseliny octové ledové R* a po kapkách 1 ml *tetrafenylboritanu sodného RS*; vznikne bílá sraženina. Směs se zfiltruje a sraženina se rozpustí ve směsi 1 ml *acetonu R* a 5 ml *lihu 96% R* zahřátím nejvýše na 70 °C.

K teplému roztoku se po kapkách přidává *voda R*, až se vytvoří slabá opalescence. Potom se znovu opatrně zahřívá do vyjasnění roztoku a nechá se ochladit. Vzniknou bílé krystaly, které se odfiltrují, promyjí třikrát 10 ml *vody R* a usuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* nebo *silikagelem bezvodým R* při teplotě nepřevyšující 50 °C; krystaly tají *(2.2.14)* při 127 °C až 133 °C.

C. K 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se přidá 0,1 ml *modři bromfenolové RS1*, 5 ml *chloroformu R* a protřepe se. Chloroformová vrstva je bezbarvá. Přidá se 0,1 ml roztoku S a protřepe se; vznikne modré zbarvení chloroformové vrstvy.

D. Ke 2 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*; vznikne bílá sraženina, která se po přidání 5 ml *lihu 96% R* rozpustí. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Aminy a amonné soli. 5,0 g se zahřátím rozpustí ve 20 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (3 + 97) a přidá se 100 ml *2-propanolu R*. Roztok se nechá pomalu probublávat proudem *dusíku R*. Postupně se přidá 12,0 ml *tetrabutylamonium-hydroxidu 0,1 mol/l VS* a zaznamená se potenciometricky *(2.2.20)* titrační křivka. Vykazuje-li titrační křivka dva inflexní body, objem titračního roztoku přidaný mezi těmito body není větší než 5,0 ml. Nevykazuje-li titrační křivka žádný inflexní bod, zkoušená látka nevyhovuje této zkoušce. Vykazuje-li titrační křivka jeden inflexní bod, opakuje se zkouška, ale před titrací se přidají 3,0 ml roztoku *dimethyltetradecylaminu R* (25 g/l) v *2-propanolu R*. Vykazuje-li titrační křivka po přidání 12,0 ml stejného titračního činidla pouze jeden inflexní bod, zkoušená látka nevyhovuje této zkoušce.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 10 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

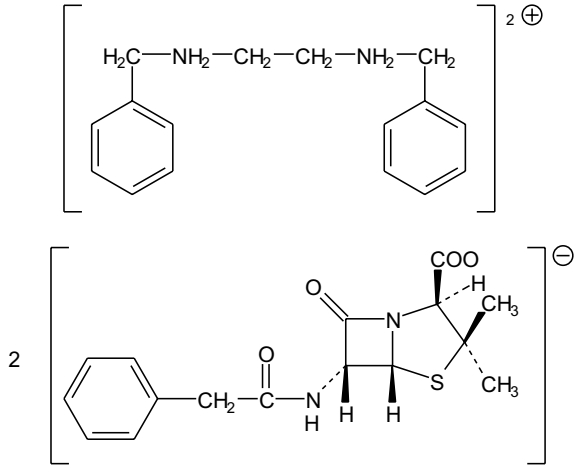
2,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se přenese do dělicí nálevky, přidá se 25 ml *chloroformu R*, 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l). Dobře se protřepe, nechají se oddělit vrstvy a chloroformová vrstva se odstraní. Vodná vrstva se protřepe třikrát 10 ml *chloroformu R* a chloroformové vrstvy se odstraní. K vodné vrstvě se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, nechá se ochladit a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS*, pokud se tmavě hnědý roztok prakticky neodbarví. Potom se přidají 2 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za intenzivního třepání, dokud se barva chloroformové vrstvy již dále nemění. Současně se provede slepá zkouška se směsí 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l), 20 ml *vody R* a 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 35,40 mg $C_{22}H_{40}ClN$.

† Benzathini benzylpenicillinum

Benzathin-benzylpenicilin

Synonyma. Benzylpenicillinum benzathinum, Benzylpenicillinum benzathinicum



$C_{48}H_{56}N_6O_8S_2$ M_r 909,13 CAS 1538-09-6

Je to sůl kyseliny (6*R*)-6-(2-fenylacetamido)penicilanové s N,N'-dibenzylethylendiaminem (2 : 1). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 100,5 % penicilinu (počítáno jako $C_{48}H_{56}N_6O_8S_2$) a 24,0 % až 27,0 % N,N'-dibenzylethylendiaminu ($C_{16}H_{20}N_2$; M_r 240,35). Látka obsahuje proměnlivé množství vody. Může být přidán stabilizátor disperze částic nebo suspenze.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu a ve formamidu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *benzathin-benzylpenicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok. 25 mg *benzathin-benzylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 *amoniakem 17,5% RS*, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a pozoruje se v denním světle. Dvě hlavní skvrny na

chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, barvou a velikostí dvěma hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky dlouhé asi 150 mm a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zbarvení.

D. K 0,1 g se přidají 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 2 min se protřepává. Poté se směs vytřepe dvakrát 3 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se odpaří do sucha a odparek se rozpustí v 1 ml *lihu R* 50% (*V/V*). Přidá se 5 ml *trinitrofenolu RS*, 5 min se zahřívá při 90 °C a nechá se pomalu zchladnout. Krystaly se oddělí a překrystalují se z roztoku *trinitrofenolu R* (10 g/l) v *lihu R (V/V)*. Krystaly tají (*2.2.14*) při asi 214 °C.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 0,50 g se přidá 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se protřepává a zfiltruje se filtrem ze slinutého skla. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*; roztok je zelený nebo žlutý. Ke změně zbarvení roztoku do modra se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 5,0 % až 8,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Sterilita *(2.6.1)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogeny, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1 ml supernatantní tekutiny připravené takto: 40 mg se suspenduje ve 20 ml *vody na injekci R,* důkladně se protřepe a odstřeďuje se.

Stanovení obsahu

N,N'-Dibenzylethylendiamin. K 1,0000 g se přidá 30 ml nasyceného roztoku *chloridu sodného R* a 10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l). Vytřepe se čtyřikrát 50 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se třikrát promyjí 10 ml *vody R*. Spojené vodné výtřepky se promyjí 25 ml *etheru R*, který se přidá k etherové vrstvě. Ta se odpaří na malý objem, k němuž se přidají 2 ml *ethanolu R*, a odpaří se do sucha. Odparek se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,02 mg $C_{16}H_{20}N_2$.

Peniciliny.

Rozkladné produkty. 0,2500 g se rozpustí v 50 ml *methanolu R* a přidá se 25 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a ihned se titruje *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS*. Bod ekvivalence se stanoví potenciometricky (*2.2.20*) za použití srovnávací merkurosulfatové elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody.

Obsah rozkladných produktů (*D*) vyjádřený jako $C_{48}H_{56}N_6O_8S_2$ se v procentech vypočte ze vzorce:

$$\frac{0{,}909n}{m},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech.

Peniciliny. 70,0 mg se rozpustí v 20 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *vody R* a 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a nechá se 15 min stát. Poté se přidá 5,0 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l RS*, 20 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a 20 ml *vody R*. Titruje se při 35 °C až 40 °C *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS*. Bod ekvivalence se stanoví potenciometricky (*2.2.20*) za použití srovnávací merkurosulfatové elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody. Titruje se tak pomalu, aby titrace trvala 15 min. Předběžná inflexe na titrační křivce se nebere v úvahu.

Obsah penicilinů vyjádřený jako $C_{48}H_{56}N_6O_8S_2$ se v procentech vypočte ze vzorce:

$$\frac{0{,}909n_1}{m_1} - D,$$

v němž značí:
m_1 - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 VS* v mililitrech,
D - obsah rozkladných produktů v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních zabezpečených obalech.

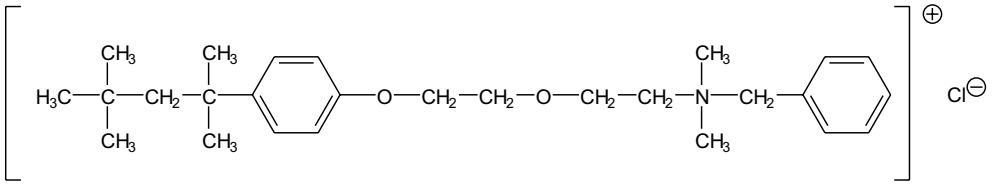
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede název a množství eventuálně přidaného stabilizátoru částic nebo suspenze a to, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

Benzethonii chloridum

Benzethoniumchlorid



$C_{27}H_{42}ClNO_2$ M_r 448,09 CAS 121-54-0

Je to benzyldimethyl{2-[2-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenoxy]ethoxy]ethyl}amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{27}H_{42}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, snadno rozpustný v dichlormethanu. Vodné roztoky při třepání silně pění.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 158 °C až 164 °C; stanoví se po vysušení při 105 °C po dobu 4 h.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *benzethoniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *methanolu R* (5 + 5 + 100) po dráze 12 cm. Vrstva se vysuší proudem teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se přidá 0,1 ml *modři bromfenolové RS1*, 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe se; spodní vrstva je bezbarvá. Potom se přidá 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, a znovu se protřepe; spodní vrstva se zbarví modře.

D. Ke 2 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*; vznikne bílá sraženina, která se rozpustí po přidání 5 ml *lihu 96% R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 25 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je růžový. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je oranžově červený.

Těkavé báze a jejich soli *(2.4.1)*. 0,20 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (50 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*. Oxid hořečnatý těžký se nahradí 2,0 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C po dobu 4 h.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l), 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l) a 25 ml *dichlormethanu R*. Silně se protřepe, vrstvy se nechají oddělit a spodní vrstva se odstraní. Horní vrstva se protřepe třikrát s 10 ml *dichlormethanu R* a spodní vrstva se vždy odstraní. K horní vrstvě se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, ochladí se a titruje *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS*, dokud tmavě hnědé zbarvení roztoku téměř nevymizí. Přidají se 4 ml *dichlormethanu R* a pokračuje se v titraci za silného protřepávání, dokud nevymizí hnědé zabarvení spodní vrstvy. Provede se slepá zkouška za použití směsi 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l), 20 ml *vody R* a 40 ml *kyseliny chlorovodíkové-R*.

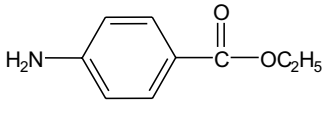
1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 44,81 mg $C_{27}H_{42}ClNO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Benzocainum

Benzokain



$C_9H_{11}NO_2$ M_r 165,19 CAS 9-09-74

Je to ethyl-4-aminobenzoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{11}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 89 °C až 92 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *benzokainu CRL*.

C. K asi 50 mg ve zkumavce se přidá 0,2 ml roztoku *oxidu chromového R* (500 g/l). Ústí zkumavky se překryje filtračním papírem navlhčeným čerstvě připravenou směsí stejných objemových dílů roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) a roztoku *piperazinu hexahydrátu R* (200 g/l) a mírně se vaří nejméně 30 s; na filtračním papíře se objeví modré zabarvení.

D. Asi 50 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku vyhovují zkoušce na primární aromatické aminy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného za použití 0,05 ml *fenolftaleinu RS*. Přidá se 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*; roztok zůstává bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené láky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve směsi 25 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 50 ml *vody R* a provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech *(2.5.8)*.

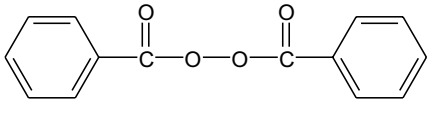
1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,52 mg $C_9H_{11}NO_2$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Benzoylis peroxidum cum aqua

Hydratovaný benzoylperoxid



$C_{14}H_{10}O_4$ M_r 242,23 CAS 94-36-0

Je to hydratovaný dibenzoylperoxid. Obsahuje 70,0 % až 77,0 % sloučeniny $C_{14}H_{10}O_4$ a nejméně 20,0 % vody.

Vlastnosti

Bílý amorfní nebo granulovaný prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a dichlormethanu (za vylučování vody), těžce rozpustný v lihu 96%. Na vzduchu rychle ztrácí vodu.

Zkoušená látka se před provedením následujících zkoušek důkladně promíchá.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 80,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml (roztok A). Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v rozmezí 250 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 274 nm a prodlevu při asi 282 nm. 10,0 ml roztoku A se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml (roztok B). Měří se absorbance tohoto roztoku v rozmezí 220 nm až 250 nm; roztok B vykazuje absorpční maximum při 235 nm. Poměr absorbance v maximu při 235 nm (roztok B) k maximu při 274 nm (roztok A) je 1,17 až 1,21.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. hydratovaného benzoylperoxidu.*

C. Asi 25 mg se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*, přidá se 1 ml roztoku *diethylfenylendiamoniumsulfatu R* (10 g/l) a promíchá se; vznikne červené zbarvení, které rychle tmavne a během 5 min přejde na tmavě fialové.

D. K 1 g se přidá 5 ml *lihu 96% R*, 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R*. Směs se vaří 20 min pod zpětným chladičem a potom se ochladí. Tento roztok vyhovuje zkoušce (c) na benzoany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. Množství odpovídající 1,0 g dibenzoylperoxidu se rozpustí ve 25 ml *acetonu R*, přidá se 75 ml *vody R* a zfiltruje se. Filtr se promyje dvakrát 10 ml *vody R* a k filtrátu spojenému s promývací *vodou R* se přidá 0,25 ml *fenolftaleinu RS1*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,25 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu $GF_{254}R$. Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 0,20 g dibenzoylperoxidu se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *kyseliny benzoové R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,4 ml *benzylbenzoatu R* se smíchá s 5 ml *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml zkoušeného roztoku a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *acetonu R*, *toluenu R* a *etheru petrolejového R* (1 + 15 + 20 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá 20 min sušit na vzduchu a potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající skvrně kyseliny benzoové intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %); žádná skvrna, mimo hlavní skvrny a skvrny odpovídající kyselině benzoové, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že porovnávací roztok (c) vykazuje dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. Množství zkoušené látky odpovídající 0,5 g dibenzoylperoxidu se rozpustí v 15 ml *acetonu R*. Za stálého míchání se přidá 50 ml *kyseliny dusičné 0,05 mol/l RS*, nechá se 10 min stát a zfiltruje se. Zbytek se promyje dvakrát 10 ml stejné kyseliny. Filtráty se spojí a zředí se *kyselinou dusičnou 0,05 mol/l RS* na 100 ml. 2,5 ml se zředí *vodou R* na 15,0 ml a tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,4 %).

Stanovení obsahu

2,500 g se bezprostředně před stanovením rozpustí v 75 ml *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml (roztok a).

Dibenzoylperoxid. K 5,0 ml roztoku (a) se přidá 20 ml *acetonu R*, 3 ml roztoku *jodidu draselného R* (500 g/l) a promíchá se. Nechá se 1 min stát a potom se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* do odbarvení roztoku. Provede se slepá zkouška.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,11 mg $C_{14}H_{10}O_4$.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Ke směsi 20,0 ml *methanolu bezvodého R* a 3,0 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) v *dimethylformamidu R* se přidá 5,0 ml roztoku (a) a před titrací se 5 min míchá. Provede se slepá zkouška.

Vypočítá se obsah vody v procentech podle vztahu:

$$\frac{2 \,.\, (n_1 - n_2) \,.\, w}{m} + (0{,}0744 \,.\, p),$$

v němž značí:

n_1 - spotřebu *jodosiřičitého činidla VS* v mililitrech,

n_2 - spotřebu *jodosiřičitého činidla VS* na slepou zkoušku v mililitrech,

w - obsah vody v *jodosiřičitém činidle VS* v miligramech na mililitr,

m - hmotnost zkoušené látky použité na přípravu roztoku (a) v gramech,

p - obsah dibenzoylperoxidu v procentech.

Uchovávání

V obalech vybavených zařízením k redukci statického výboje a nadměrného tlaku, při teplotě 2 °C až 8 °C, chráněn před světlem.

Separandum.

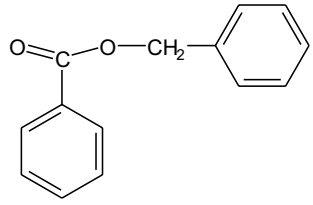
Upozornění

Hydratovaný benzoylperoxid je při teplotě vyšší než 60 °C a při sníženém obsahu vody výbušný. V přítomnosti redukujících látek je výbušný a zápalný. Nepoužité zbytky se nesmějí vracet zpět do nádoby, je nutno je rozkládat působením roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l), dokud se z přidaného krystalu *jodidu draselného R* po okyselení *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* uvolňuje jod.

Benzylis benzoas

Benzylbenzoat

Synonymum. Benzylum benzoicum



$C_{14}H_{12}O_2$ M_r 212,25 CAS 120-51-4

Je to benzylester kyseliny benzoové. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{14}H_{12}O_2$.

Vlastnosti

Bezbarvé nebo téměř bezbarvé krystaly nebo bezbarvá nebo téměř bezbarvá olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96%, etherem, dichlormethanem, mastnými oleji a silicemi.

Teplota varu je asi 320 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. benzylbenzoatu.*

B. Ke 2 g se přidá 25 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Ethanol se odpaří na vodní lázni, přidá se 50 ml *vody R* a destiluje se. Zachytí se asi 25 ml destilátu pro zkoušku C. Tekutina, která zůstala v destilační baňce, se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*; vznikne bílá sraženina, která po promytí *vodou R* a usušení ve vakuu taje *(2.2.14)* při 121 °C až 124 °C.

C. K destilátu ze zkoušky B se přidá 2,5 g *manganistanu draselného R* a 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, vaří se 15 min pod zpětným chladičem, ochladí se a zfiltruje. Filtrát se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*; vznikne bílá sraženina, která po promytí *vodou R* a usušení ve vakuu taje *(2.2.14)* při 121 °C až 124 °C.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 2,0 g se rozpustí v *lihu 96% R*, zředí se jím na 10 ml a přidá se *fenolftalein RS* jako indikátor. Na změnu zbarvení indikátoru do růžova se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,118 až 1,122.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,568 až 1,570.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. Nejméně 17,0 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Ke 2,000 g se přidá 50,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se opatrně 1 h pod zpětným chladičem. Horký roztok se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* za použití 1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* odpovídá 106,1 mg $C_{14}H_{12}O_2$.

Uchovávání

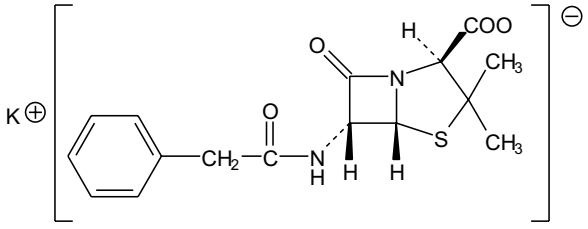
Ve vzduchotěsných, zcela naplněných obalech, chráněn před světlem.

† Benzylpenicillinum kalicum

1998

Draselná sůl benzylpenicilinu

Synonymum. Penicillinum G kalicum



$C_{16}H_{17}KN_2O_4S$ M_r 372,48 CAS 113-98-4

Je to draselná sůl kyseliny (6*R*)-6-(2-fenylacetamido)penicilanové, která se získává z určitých kmenů *Penicillinum notatum* nebo příbuzných mikroorganismů, anebo se připravuje jinými způsoby. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % draselné soli benzylpenicilinu vyjádřených jako $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *draselné soli benzylpenicilinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 25 mg zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *draselné soli benzylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *draselné soli benzylpenicilinu CRL* a 25 mg *draselné soli fenoxymethylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R*, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a pozoruje se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg zkoušené látky se převedou do zkumavky dlouhé asi 150 mm a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá rychlým otáčivým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na draslík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20,0 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +270° až +300°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 94,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. Absorbance tohoto roztoku se měří při 325 nm, 280 nm a v maximu při 264 nm; v případě potřeby se pro měření při 264 nm roztok zředí. Absorbance při 325 nm a 280 nm není vyšší než 0,10 a absorbance v maximu při 264 nm je 0,80 až 0,88, počítáno na neředěný roztok (1,88 g/l). Ověří se rozlišovací schopnost přístroje (*2.2.25*); poměr absorbancí je nejméně 1,7.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (d) a eluuje se izokraticky zvolenou mobilní fází. Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku (b) a začne se izokratická eluce. Ihned po eluci píku benzylpencilinu se použije následující lineární gradient.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 20	70 → 0	30 → 100	lineární gradient
20 - 35	0	100	izokraticky
35 - 50	70	30	znovuustavení

Nastříkne se *voda R* a použije se stejný eluční postup k provedení slepé zkoušky. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku ve *vodě na injekci R* obsahujícího 1,5 mg zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* A a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). Připraví se těsně před použitím. 80,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL se* rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL* a 10,0 mg *kyseliny fenyloctové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 4,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A*, kterou je směs 10 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (68 g/l) s upravenou hodnotou pH na 3,5 roztokem *kyseliny fosforečné R* (500 g/l), 30 objemových dílů *methanolu R* a 60 dílů *vody R*,
  - *mobilní fáze B,* kterou je směs 10 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (68 g/l) s upravenou hodnotou pH na 3,5 roztokem *kyseliny fosforečné R* (500 g/l), 40 objemových dílů *vody R* a 50 dílů *methanolu R*,
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm.

Kolona se ustaluje mobilní fází, v níž poměr fází A : B je 70 : 30. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení na chromatogramu mezi dvěma hlavními píky je nejméně 6,0 (je-li třeba, upraví se poměr A : B mobilní fáze) a kapacitní faktor pro druhý pík (benzylpenicilin) je 4,0 až 6,0. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl nejméně 3. Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a).

Vypočítá se obsah draselné soli benzylpenicilinu násobením procentuálního obsahu sodné soli benzylpenicilinu číslem 1,045.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

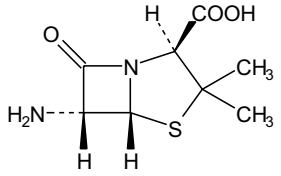
Separandum.

Označování

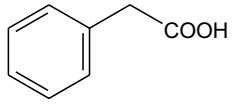
V označení na obalu se uvede, zda je látka:

- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

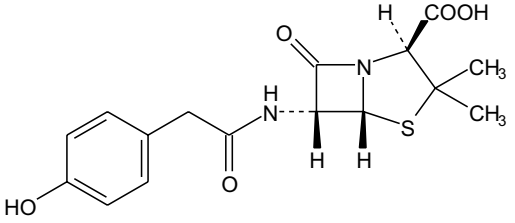
Nečistoty



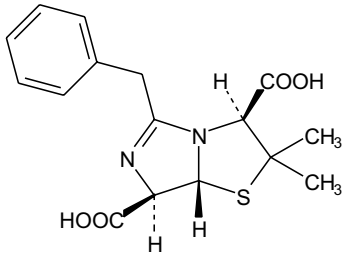
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



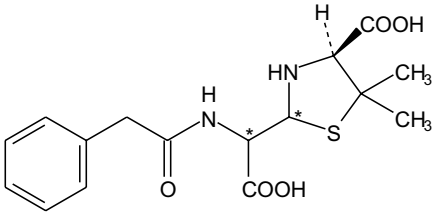
B. kyselina fenyloctová,



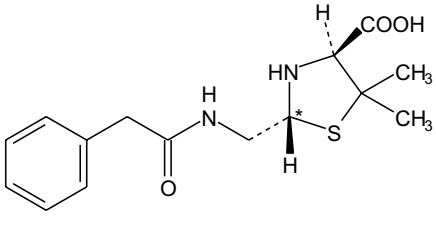
C. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-{[(4-hydroxyfenyl)acetyl]amino}-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová,



D. kyselina (3*S*,7*R*,7a*R*)-5-benzyl-2,2-dimethyl-2,3,7,7a-tetrahydroimidazo[5,1-*b*]thiazol-3,7-dikarboxylová (penilová kyselina benzylpenicilinu),



E. kyselina (4*S*)-2-{karboxy[(fenylacetyl)amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilová kyselina benzylpenicilinu),



a epimer k C*

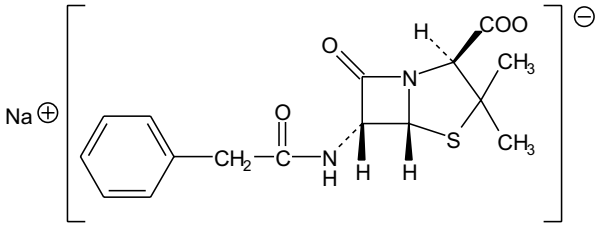
F. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[(fenylacetyl)amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilová kyselina benzylpenicilinu).

† Benzylpenicillinum natricum

1998

Sodná sůl benzylpenicilinu

Synonymum. Penicillinum G natricum



$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ M_r 356,37 CAS 69-57-8

Je to sodná sůl kyseliny (6*R*)-6-(2-fenylacetamido)penicilanové, která se získává z určitých kmenů *Penicillinum notatum* nebo příbuzných mikroorganismů, anebo se připravuje jinými způsoby. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % sodné soli benzylpenicilinu vyjádřených jako $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$.

Výroba

Jestliže se připravuje postupem, který zanechává zbytky kyseliny 2-ethylhexanové v látce, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,5 %, stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B. C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli benzylpenicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R.*
Porovnávací roztok (b). 25 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL* a 25 mg *draselné soli fenoxymethylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou*

octovou ledovou R, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a pozoruje se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg zkoušené látky se převedou do zkumavky dlouhé asi 150 mm a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá rychlým otáčivým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +285° až +310°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 90,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. Absorbance tohoto roztoku se měří při 325 nm, 280 nm a v maximu při 264 nm; v případě potřeby se pro měření při 264 nm roztok zředí. Absorbance při 325 nm a 280 nm není vyšší než 0,10 a absorbance v maximu při 264 nm je 0,80 až 0,88, počítáno na neředěný roztok (1,80 g/l). Ověří se rozlišovací schopnost přístroje (*2.2.25*); poměr absorbancí je nejméně 1,7.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (d) a eluuje se izokraticky zvolenou mobilní fází. Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku (b) a začne se izokratická eluce. Ihned po eluci píku benzylpencilinu se použije následující lineární gradient.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 20	70 → 0	30 → 100	lineární gradient
20 - 35	0	100	izokraticky
35 - 50	70	30	znovuustavení

Nastříkne se *voda R* a použije se stejný eluční postup k provedení slepé zkoušky. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku ve *vodě na injekci R* obsahujícího 1,5 mg zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* A a zředí se jí na 50,0 ml.

Zkoušený roztok (b). Připraví se těsně před použitím. 80,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL se* rozpustí v*e vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL* a 10,0 mg *kyseliny fenyloctové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 4,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provede za použití:

- kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,0 ml/min :
  - *mobilní fáze A*, kterou je směs 10 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (68 g/l) s upravenou hodnotou pH na 3,5 roztokem *kyseliny fosforečné R* (500g/l), 30 dílů *methanolu R* a 60 dílů *vody R*,
  - *mobilní fáze B*, kterou je směs 10 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (68 g/l) s upravenou hodnotou pH na 3,5 roztokem *kyseliny fosforečné R* (500 g/l), 40 objemových dílů *vody R* a 50 objemových dílů *methanolu R*,
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm.

Kolona se ustaluje mobilní fází, v níž poměr fází A : B je 70 : 30. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení na chromatogramu mezi dvěma hlavními píky je nejméně 6,0 (je-li třeba, upraví se poměr A : B mobilní fáze) a kapacitní faktor pro druhý pík (benzylpenicilin) je 4,0 až 6,0. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Systém se upraví tak, aby poměr signálu píku k šumu byl nejméně 3. Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku není větší než 1,0 %. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (a).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

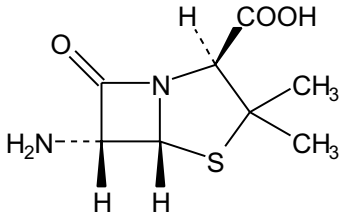
Separandum.

Označování

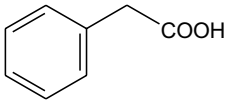
V označení na obalu se uvede, zda je látka:

- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

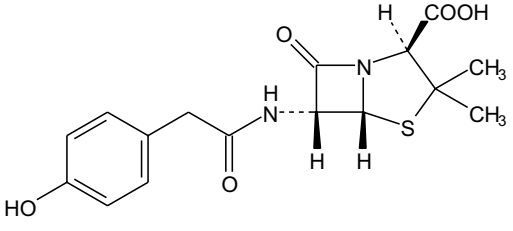
Nečistoty



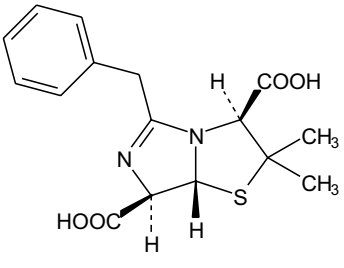
A. kyselina(2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



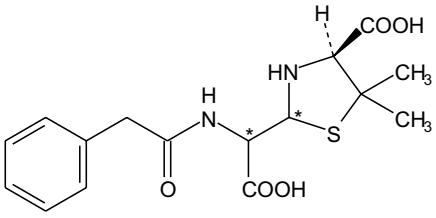
B. kyselina fenyloctová,



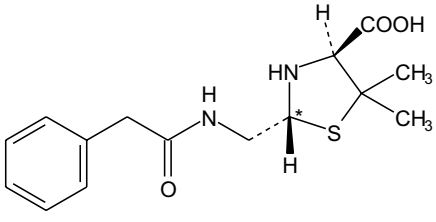
C. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-{[(4-hydroxyfenyl)acetyl]amino}-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová,



D. kyselina(3*S*,7*R*,7a*R*)-5-benzyl-2,2-dimethyl-2,3,7,7a-tetrahydroimidazo[5,1-*b*]thiazol-3,7-dikarboxylová (penilová kyselina benzylpenicilinu),



E. kyselina (4*S*)-2-{karboxy[(fenylacetyl)amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilová kyselina benzylpenicilinu),



a epimer k C*

F. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[(fenylacetyl)amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilová kyselina benzylpenicilinu).

Bergamottae etheroleum

N

Bergamotová silice

Je to silice získaná lisováním čerstvého oplodí druhu *Citrus aurantium* L. subsp. *bergamia* (RISSO. et POIT.) ENGLER.

Obsahuje nejméně 30,0 % esterů, počítáno jako linalylacetat ($C_{12}H_{20}O_2$; M_r 196,29).

Vlastnosti

Čirá žlutozelená až zelená kapalina, charakteristického pachu. Je mísitelná s ethanolem, etherem, petrolejovým etherem a mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 1 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 10 μl *linalolu R* a 20 μl *linalylacetatu R* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu,

postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrny odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je mezi startem a skvrnou linalolu patrna modrá skvrna odpovídající alfa-terpineolu; na chromatogramu mohou být další slabě zbarvené skvrny.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 1 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *bergaptenu R* a 10 mg *citroptenu R* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *hexanu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrny odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; mezi skvrnou citroptenu a čelem chromatogramu jsou patrné dvě skvrny, jedna fluoreskující modře (R_F asi 0,6) a druhá žlutě (R_F asi 0,7).

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky na čistotu Chromatografický profil. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou retenční časy hlavních píků přibližně shodné s retenčními časy hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,876 až 0,884.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,464 až 1,468.

Optická otáčivost *(2.2.7).* +8,0° až +30,0°.

Číslo kyselosti *(2.5.1).* Nejvýše 2,0; 2,0 g se rozpustí v 5 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Voda v silicích *(2.8.5).* Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7).* Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

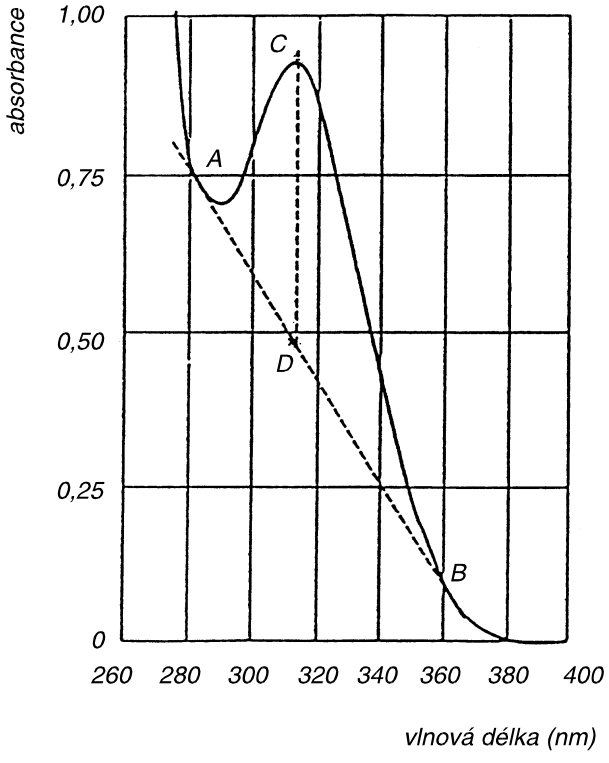
Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. 4,2 % až 6,5 %. 5 g se odpařuje na vodní lázni 6 h.

Absorbance. 0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 260 nm až 400 nm. Absorpční maximum roztoku je při 312 nm. Body A a B na absorpční křivce se spojí, viz obrázek 1. Vzdálenost bodu C od bodu D je 0,80 až 1,20.

Chromatografický profil. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28).*

Zkoušený roztok. Zkoušená látka.
Porovnávací roztok. Připraví se směs navážením 20 % uvedených množství. 0,1 g *β-pinenu R*, 0,5 g *limonenu R*, 0,1 g, *γ-terpinenu R*, 0,3 g *linalolu R*, 0,5 g *linalylacetatu R* a 0,1 g *citralu R* se rozpustí v 1 g *hexanu R.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 25 m až 60 m a vnitřního průměru asi 0,25 mm se stěnou pokrytou vázanou fází *makrogolu 20 000 R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 10 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 2 °C/min až na 180 °C, při níž se udržuje 20 min,
- teploty nástřikového prostoru 200 °C a detektoru 270 °C.



Obr. 1. Hodnocení absorpční křivky

Nastříkne se 0,2 μl porovnávacího roztoku. Při dodržení předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

Zkoušku lze hodnotit, pokud počet teoretických pater je nejméně 30 000, počítáno od píku limonenu, při teplotě 120 °C. Rozlišení mezi píky linalolu a linalylacetatu je nejméně 1,5 při teplotě 120 °C.

Nastříkne se asi 0,2 μl zkoušeného roztoku. Porovnáním s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky, které mají být přítomny ve zkoušeném roztoku, nepřihlíží se k píku hexanu.

Obsah jednotlivých látek v procentech se stanoví metodou vnitřní normalizace.

Obsah látek v procentech se pohybuje v rozmezí:

ß-pinen	5,0 % až 9,5 %,
limonen	33,0 % až 42,0 %,
γ-terpineol	6,0 % až 10,5 %,
linalool	7,0 % až 15,0 %,
linalylacetat	22,0 % až 33,0 %,
geranial[1]	nejvýše 0,5%.

[1] Citral je směs izomeru E (geranial) a izomeru Z (neral). Nejprve se eluuje neral, pak geranial.

Bergapten. 0,15 % až 0,35 %. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,200 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *bergaptenu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 15 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). 20 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *hexanu R* (15 + 85), s průtokovou rychlostí 1,2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 310 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně 10 μl porovnávacího roztoku (c), (d) a (e) a 10 μl zkoušeného roztoku. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže počet teoretických pater je nejméně 5000, počítáno od píku bergaptenu, a rozlišení mezi píky bergaptenu a citroptenu je nejméně 2,5. Relativní retenční čas píku citroptenu na chromatogramu zkoušeného roztoku činí asi 0,8násobek relativního retenčního času píku bergaptenu. Sestrojí se kalibrační graf z ploch píků porovnávacích roztoků (c), (d) a (e) a koncentrací těchto roztoků.

Metodou absolutní kalibrace, vyhodnocením z kalibračního grafu, se vypočítá obsah bergaptenu ve 100 ml zkoušeného roztoku.

Obsah bergaptenu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_1 \cdot 100}{m},$$

v němž značí:
m - množství zkoušené látky v gramech,
m_1 - množství bergaptenu v gramech obsažené ve 100 ml roztoku.

Stanovení obsahu

2,000 g se ve 100ml baňce smíchají s 20,00 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Pak se rychle ochladí, přidá se 50 ml *vody R*, 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah esterů, vyjádřeno jako linalylacetat ($C_{12}H_{20}O_2$), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{9{,}815\ (n_1 - n)}{p},$$

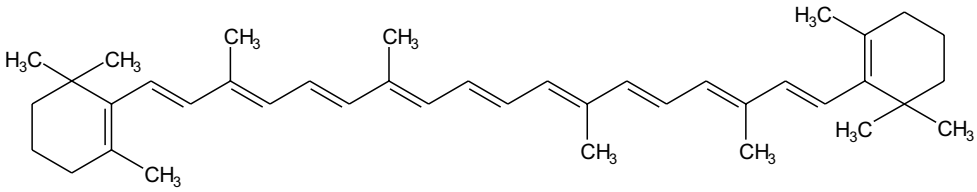
v němž značí:
n - množství *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech spotřebované při vlastním stanovení,
n_1 - množství *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech spotřebované při slepé zkoušce,
p - hmotnost zkoušené látky v gramech.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem a teplem.

Betacarotenum

Betakaroten



$C_{40}H_{56}$ M_r 536,88 CAS 7235-40-7

Je to (all-*E*)-1,19-(3,7,12,16-tetramethyl-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadekanonaen-1,18-diyl)bis-[2,6,6-trimethylcyclohexen]. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{40}H_{56}$.

Vlastnosti

Hnědočervený nebo nahnědle červený krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v cyklohexanu a v etheru, prakticky nerozpustný v ethanolu. Je citlivý na vzduch, teplo a světlo, zvláště ve formě roztoku.

Práce s ním se musí provádět tak rychle, jak je to jen možné, aby se nevystavil působení světla; používají se čerstvě připravené roztoky.

Zkoušky totožnosti

50,0 mg zkoušené látky se rozpustí v 10 ml *chloroformu R* a zředí se okamžitě na 100,0 ml *cyklohexanem R*. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml (roztok A; tento roztok se použije též pro zkoušku Příbuzné látky). 5,0 ml roztoku A se zředí *cyklohexanem R* na 50,0 ml (roztok B; tento roztok se použije též pro zkoušku Příbuzné látky a pro Stanovení obsahu). Měří se absorbance *(2.2.25)* při 455 nm až 483 nm za použití *cyklohexanu R* jako kontrolní tekutiny. Poměr absorbance měřené při 455 nm k absorbanci měřené při 483 nm je 1,14 až 1,18.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku B při 455 nm a roztoku A při 340 nm, viz Zkoušky totožnosti. Poměr absorbance měřené při 455 nm k absorbanci měřené při 340 nm je nejméně 1,5.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g zkoušené látky vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 µl/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2 ml základního *roztoku olova (10 mg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,2 %; 1,000 g zkoušené látky se suší 4 h ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* při 40 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky navlhčené směsí 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 5 ml *lihu 96% R*.

Stanovení obsahu

Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku B, viz Zkoušky totožnosti, v maximu při 455 nm, za použití *cyklohexanu R* jako kontrolní tekutiny. K výpočtu obsahu sloučeniny $C_{46}H_{56}$ se použije specifická absorbance, která má hodnotu 2500.

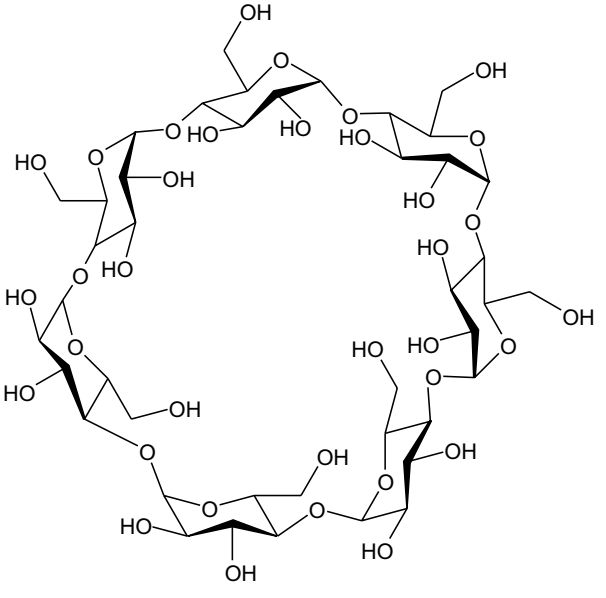
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nejvýše 25 °C.

Betadexum

Betadex

Synonymum. Betacyclodextrinum



$[C_6H_{10}O_5]_7$ M_r 1134,99 CAS 7585-39-9

Je to cyklo-α-(1→4)-D-heptaglukopyranosid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $[C_6H_{10}O_5]_7$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý amorfní nebo krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v propylenglykolu, prakticky nerozpustný v ethanolu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) ze zkoušky Stanovení obsahu jsou retenční čas a velikost hlavního píku přibližně shodné s retenčním časem a velikostí hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

C. 0,2 g se rozpustí zahřátím ve vodní lázni ve 2 ml *jodu RS4* a nechá se stát při pokojové teplotě; vzniká žlutohnědá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,000 g se rozpustí zahřátím ve *vodě R*, ochladí se a zředí se jí na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 8,0; měří se následující roztok: 10 ml roztoku S se smíchá s 0,1 ml nasyceného roztoku *chloridu draselného R*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +160° až +164°, počítáno na látku předepsaným způsobem vysušenou; měří se roztok S.

Redukující cukry.

Zkoušený roztok. K 1 ml roztoku S se přidá 1 ml *vínanu měďnatého RS4*, zahřívá se 10 min ve vodní lázni a ochladí se na pokojovou teplotu. Potom se přidá 10 ml *zkoumadla molybdenan-hexaamonného R1* a nechá se 15 min stát.

Porovnávací roztok. Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok s tím, že se použije 1 ml roztoku *glukosy R* (0,02 g/l).

Měří se absorbance *(2.2.25)* zkoušeného a porovnávacího roztoku v maximu při 740 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance zkoušeného roztoku není vyšší než absorbance porovnávacího roztoku (0,2 %).

Absorbující nečistoty. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku S při 230 nm až 750 nm. Absorbance při 230 nm až 350 nm není vyšší než 0,10 a při 350 nm až 750 nm není vyšší než 0,05.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)* za podmínek uvedených ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se odděleně zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nejsou plochy píků odpovídajících gamacyklodextrinu a alfacyklodextrinu větší než polovina plochy těchto píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píků alfacyklodextrinu a gamacyklodextrinu, není větší než polovina plochy píku betacyklodextrinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Zbytková rozpouštědla. Nejvýše 10 µg/g trichlorethylenu a nejvýše 10 µg/g toluenu. Stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití metody standardního přídavku a *dichlorethanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok. Do čtyř stejných 20ml lahviček pro opakovaný odběr se vpraví po 500 mg zkoušené látky, rozpustí se ve *vodě R*, přidá se po 0,10 g *chloridu vápenatého R* a po 30 µl *α-amylasy RS*. Do třech z těchto nádobek se odděleně přidá po 1 ml každého z porovnávacích roztoků. Potom se roztoky zředí *vodou R* na 10 ml.

Porovnávací roztoky. Připraví se roztoky obsahující v 1000 ml 5 µl, 10 µl a 15 µl *trichlorethylenu R* a *toluenu R* a 10 µl *dichlorethanu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kolony délky 25 m a vnitřního průměru 0,32 mm pokryté filmem (1 µm) *makrogolu 20 000 R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C, teplota nástřikového prostoru je 140 °C a teplota detektoru je 280 °C. Vzorky se umístí na 2 h do termostatované komory při 45 °C. Nastříkne se odděleně po 200 µl plynné fáze ze všech nádobek. Nastříknutí se provede nejméně třikrát. Retenční čas toluenu je asi 10 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky trichlorethylenu a toluenu a mezi píky toluenu a dichlorethanu je větší než 1,1 a relativní standardní odchylky poměrů ploch píků trichlorethylenu a toluenu k píku dichlorethanu jsou menší než 5 %.

Vypočítá se obsah trichlorethylenu a toluenu. K výpočtu se použijí hodnoty relativních hustot: pro trichlorethylen 1,46 a pro toluen 0,87.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 16,0 %; 1,000 g se zahřívá 2 h v sušárně při 120 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí zahřátím ve *vodě R*, ochladí se a zředí se jí na 25,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *alfacyklodextrinu CRL,* 25,0 mg *gamacyklodextrinu CRL* a 50,0 mg *betacyklodextrinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 25,0 mg *betacyklodextrinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (10 + 90),
- refraktometrického detektoru,
- dávkovací smyčky.

Při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min se kolona promývá do ustavení rovnováhy po dobu asi 3 h. Nastříkne se odděleně po 50 µl všech roztoků. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času betacyklodextrinu. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku gamacyklodextrinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) byla v rozmezí 55 % až 75 % celé stupnice zapisovače. Retenční čas betacyklodextrinu je asi 10 min, relativní retenční čas gamacyklodextrinu je asi 0,3 a alfacyklodextrinu je asi 0,45. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky gamacyklodextrinu a alfacyklodextrinu není menší než 1,5 a relativní standardní odchylka plochy píků betacyklodextrinu na chromatogramech nejvýše 2,0 %. Podle potřeby se upraví koncentrace methanolu v mobilní fázi.

Obsah $[C_6H_{10}O_5]_7$ v procentech se vypočte z plochy hlavního píku na chromatogramech zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) a deklarovaného obsahu *betacyklodextrinu CRL*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

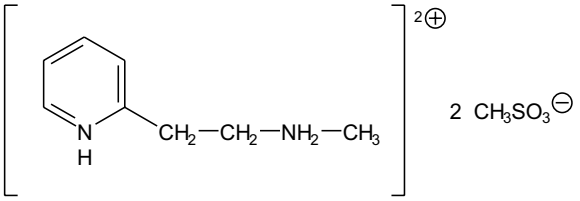
Nečistoty

A. alfacyklodextrin,
B. gamacyklodextrin.

† Betahistini dimesilas

Betahistiniumdimesilat

Synonymum. Betahistini mesilas



$C_{10}H_{20}N_2O_6S_2$ M_r 328,40 CAS 54856-23-4

Je to 2-[(2-methylamonio)ethyl]pyridiniumbis(methansulfonat). Počítáno na bezvodou a 2-propanolu prostou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{20}N_2O_6S_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický, silně hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a velmi těžce rozpustný v 2-propanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 108 °C až 112 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *betahistiniumdimesilatu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenční přísadou pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 2 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *betahistiniumdimesilatu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 2 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethylacetatu R* a *methanolu R* (0,75 + 15 + 30) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min při 110 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K 0,1 g se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepává se asi 5 min. Přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1*; roztok zůstane čirý. K dalšímu 0,1 g se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, promíchá se a žíhá až do získání bílého zbytku, který se nechá ochladit a rozpustí se v 7 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,0 až 3,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *betahistiniumdimesilatu CRL* a 10 mg *2-vinylpyridinu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí na 50,0 ml mobilní fází.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí na 10,0 ml mobilní fází.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: 2,0 g *laurylsíranu sodného R* se rozpustí ve směsi objemových dílů roztoku *kyseliny sírové R* 10% (*V/V*), *tetrabutylamoniumdihydrogensulfatu R* (17 g/l) a *vody R* (15 + 35 + 650). Hodnota pH se upraví *hydroxidem sodným zředěným RS* na 3,3 a smíchá se s 300 objemovými díly *acetonitrilu R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 260 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Použije-li se zapisovač, nastaví se citlivost systému tak, aby výška prvního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 70 % celé stupnice zapisovače.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je rozlišení mezi píky 2-vinylpyridinu a betahistiniumdimesilatu nejméně 3,5.

Nastříkne se po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (b) a (c). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času betahistiniumdimesilatu, který je asi 8 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

2-propanol. Nejvýše 0,5 %; stanoví se zkouškou na zbytková rozpouštědla (*2.4.24*).

Chloridy (*2.4.4*). Ke 14 ml roztoku S se přidá 1 ml *vody R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (35 μg/g).

Sírany (*2.4.13*). 6 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (250 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %; provede se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

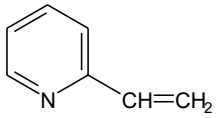
0,140 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *acetanhydridu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,42 mg $C_{10}H_{20}N_2O_6S_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsném obalu.
Separandum.

Nečistoty

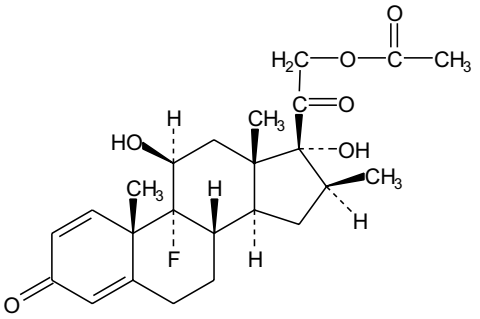


A. 2-vinylpyridin.

† Betamethasoni acetas

1998

Betamethasonacetat



$C_{24}H_{31}FO_6$ M_r 434,50 CAS 987-24-6

Je to 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-acetat. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{24}H_{31}FO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zabroušené skleněné zkumavky s uzávěrem, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazin v kyselině sírové RS*, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 419 nm není větší než 0,10.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *betamethasonacetatu CRL*. Pokud spektra získaná v pevném stavu vykazují rozdíly, odděleně se zkoušená látka a referenční látka rozpustí v co nejmenším objemu *methanolu R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a znovu se zaznamenají spektra se zbytky obou látek.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *betamethasonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *prednisolonacetatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) smíchaná se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77), po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červenohnědé zbarvení. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

E. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se vychladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* tak, aby roztok zůstal bezbarvý. Zfiltruje se a 1 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanu-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se stát 5 min. Současně se

stejným způsobem provede slepá zkouška. Roztok se zkoušenou látkou je zbarven žlutě, roztok získaný při slepé zkoušce je červený.

F. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +120° až +128°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *acetonitrilu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *betamethasonacetatu CRL* a 2 mg *dexamethasonacetatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 380 ml *acetonitrilu R* s 550 ml *vody R*, nechá se ustálit a pak se doplní *vodou R* po značku a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje do ustavení rovnováhy po dobu asi 30 min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: dexamethasonacetatu asi 22 min, betamethasonacetatu asi 19 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky dexamethasonacetatu a betamethasonacetatu je nejméně 3,3. V případě potřeby se upraví koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a pokračuje se v zaznamenávání chromatogramu po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,25 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

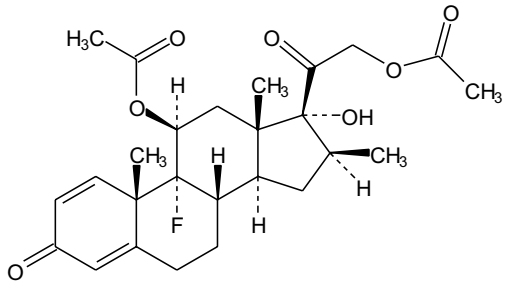
0,100 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Změří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 240 nm a vypočítá se obsah $C_{24}H_{31}FO_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 350.

Uchovávání

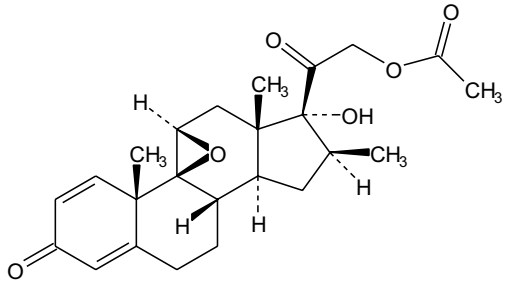
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. betamethason,
B. dexamethason-21-acetat,



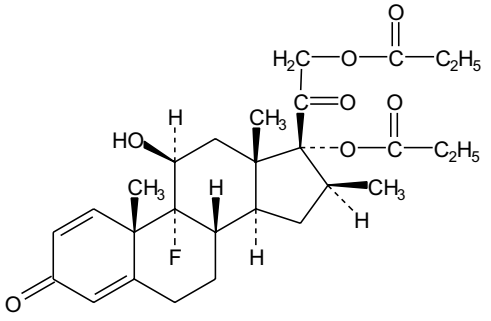
C. betamethason-11,21-diacetat,



D. 9,11β-epoxy-17,21-dihydroxy-16β-methyl-9β-pregna-1,4-dien-3,20-dion-21-acetat.

† Betamethasoni dipropionas

Betamethasondipropionat



$C_{28}H_{37}FO_7$ M_r 504,59 CAS 5593-20-4

Je to 9-fluor-11ß,17,21-trihydroxy-16ß-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-17,21-dipropionat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{28}H_{37}FO_7$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zabroušené skleněné zkumavky s uzávěrem, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 419 nm není větší než 0,10.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *betamethasondipropionatu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *betamethasondipropionatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *deoxykortonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se jí na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) přidané ke směsi objemových dílů

etheru R a *dichlormethanu R* (15 + 77), po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zabroušené zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 2 h při 45 °C za ochrany před světlem a pak se nechá vychladnout.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *betamethasondipropionatu CRL* se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zábrusové zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 2 h při 45 °C za ochrany před světlem a ochladí se.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním ke směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu odpovídajících porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

E. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červenohnědé zbarvení. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

F. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se vychladnout, přidá se 1 ml *vody R*,

0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* tak, aby roztok zůstal bezbarvý. Zfiltruje se a 1 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanu-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se stát 5 min. Současně se stejným způsobem provede slepá zkouška. Roztok se zkoušenou látkou je zbarven žlutě, roztok získaný při slepé zkoušce je červený.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +63° až +70°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *betamethasondipropionatu CRL* a 2,5 mg *beklomethasondipropionatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: 600 ml *acetonitrilu R* se opatrně smíchá s 350 ml *vody R*, po ustálení se zředí *vodou R* na 1000 ml a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm, jehož citlivost byla nastavena tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla 70 % až 90 % stupnice zapisovače.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: betamethasondipropionatu asi 9 min, beklomethasondipropionatu asi 10,7 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky betamethasondipropionatu a beklomethasondipropionatu je nejméně 2,5. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu R* v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,75násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %) a nejvýše plocha jednoho takového píku je větší než polovina hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %). K píkům s plochou menší, než je 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b), se nepřihlíží.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

50,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 240 nm.

Vypočítá se obsah $C_{28}H_{37}FO_7$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 305.

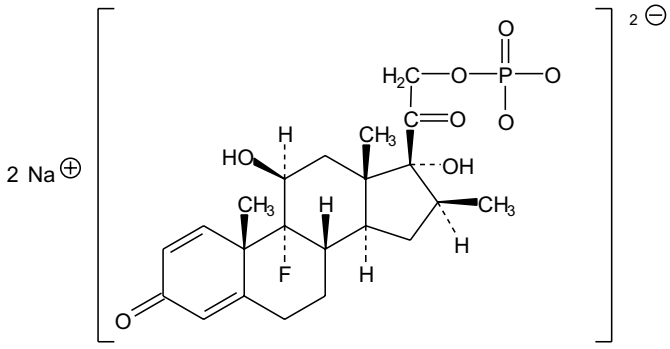
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Betamethasoni natrii phosphas

1998

Sodná sůl betamethasonfosfatu



$C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ M_r 516,41 CAS 151-73-5

Je to disodná sůl 9-fluor-11ß,17,21-trihydroxy-16ß-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-fosfatu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek, velmi hygroskopický. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *ethanolem R* na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zabroušené skleněné zkumavky s uzávěrem, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená v maximu při 450 nm není větší než 0,10.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli betamethasonfosfatu CRL*. Pokud spektra získaná v pevném stavu vykazují rozdíly, odděleně se zkoušená látka a referenční látka rozpustí v co nejmenším objemu *lihu 96% R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a znovu se zaznamenají spektra se zbytky obou látek.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *sodné soli betamethasonfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *sodné soli prednisolonfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové R, vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě skvrny, které nemusí být zcela odděleny.

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červenohnědé zbarvení. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

E. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se vychladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* tak, aby roztok zůstal bezbarvý. Zfiltruje se a 1 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanu-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se stát 5 min. Současně se stejným způsobem provede slepá zkouška. Roztok se zkoušenou látkou je zbarven žlutě, roztok získaný při slepé zkoušce je červený.

F. K asi 40 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a směs se opatrně zahřívá až do vzniku bílého dýmu. Pak se za současného zahřívání přidává po kapkách *kyselina dusičná R,* až je výsledný roztok téměř bezbarvý. Po ochlazení se přidají 2 ml *vody R* a opakuje se zahřívání až do vzniku bílého dýmu. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a roztok se neutralizuje *amoniakem zředěným RS1* na *papír lakmusový červený R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)* a zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,0; měří se roztok připravený zředěním 1 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 5 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +98° až +104°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli betamethasonfosfatu CRL* a 25 mg *sodné soli dexamethasonfosfatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: do 250ml kuželové baňky se naváží 1,360 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 0,600 g *hexylaminu R*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Potom se směs rozpustí ve 185 ml *vody R*, přidá se 65 ml *acetonitrilu R*, promíchá se a zfiltruje se (0,45 μm),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Citlivost se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) činila 70 % až 90 % stupnice zapisovače. Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: sodné soli betamethasonfosfatu asi 14 min, sodné soli dexamethasonfosfatu asi 15,5 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky disodné soli dexamethasonfosfatu a sodné soli betamethasonfosfatu je nejméně 2,0. V případě potřeby se zvýší koncentrace *acetonitrilu R* nebo *vody R* v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2 %) a nejvýše jeden takový pík má plochu větší, než je polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Anorganické fosforečnany. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R*, promíchá se a nechá se 5 min stát. Případně vzniklé žluté zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku fosforečnanů (5 μg PO_4/ml)* (1 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241 nm.

Vypočítá se obsah $C_{22}H_{28}FNa_2O_8$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 297.

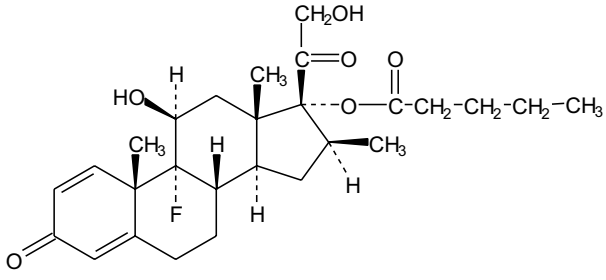
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Betamethasoni valeras

Betamethasonvalerat



$C_{27}H_{37}FO_6$ M_r 476,58 CAS 2152-44-5

Je to 9-fluor-11ß,17,21-trihydroxy-16ß-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-17-valerat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{27}H_{37}FO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 192 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, E, F a G, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zabroušené skleněné zkumavky s uzávěrem, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 419 nm není větší než 0,10.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *betamethason-valeratu CRL*. Pokud spektra získaná v pevném stavu vykazují rozdíly, odděleně se zkoušená látka a referenční látka rozpustí v co nejmenším objemu *chloroformu R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a znovu se zaznamenají spektra zbytků obou látek.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *betamethason 17-valeratu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *betamethason 21-valeratu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se jí na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) přidaná ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77), po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

E. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zabroušené zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 3 h při 45 °C za ochrany před světlem a pak se nechá vychladnout.

Porovnávací roztok (a). 25 mg *betamethason 17-valeratu CRL* se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zábrusové zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 3 h při 45 °C za ochrany před světlem a ochladí se.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušných porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

F. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červenohnědé zbarvení. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

G. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se vychladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* tak, aby roztok zůstal bezbarvý. Zfiltruje se a 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanu-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se stát 5 min. Současně se stejným způsobem provede slepá zkouška. Roztok se zkoušenou látkou je zbarven žlutě, roztok získaný při slepé zkoušce je červený.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +75° až +82°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním *dioxanem R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *betamethason 17-valeratu CRL* a 2 mg *betamethason 21-valeratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: 350 ml *vody R* se opatrně smíchá s 600 ml *acetonitrilu R*, nechá se ustálit, doplní se *vodou R* na 1000 ml a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm, jehož citlivost se nastavení tak, aby výška hlavního píku porovnávacího roztoku (b) činila 70 % až 90 % stupnice zapisovače.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min. Natříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: betamethason 17-valeratu asi 7 min, betamethason 21-valeratu asi 9 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky betamethason 17-valeratu a betamethason 21-valeratu není menší než 5,0. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu R*.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než 0,75násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %) a nejvýše jeden takový pík má plochu větší, než je polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 240 nm.

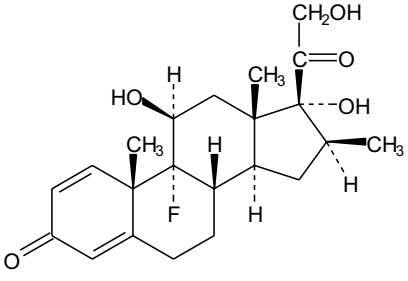
Vypočítá se obsah $C_{27}H_{37}FO_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 325.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Betamethasonum

Betamethason



$C_{22}H_{29}FO_5$ M_r 392,47 CAS 378-44-9

Je to 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{22}H_{29}FO_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se převedou do zkumavky se zbroušenou zátkou, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, směs se promíchá a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C. Rychle se ochladí a měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 419 nm; absorbance není větší než 0,10.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *betamethasonu CRL*. Jestliže se spektra látek v pevném stavu liší, rozpustí se zkoušená látka a referenční látka jednotlivě v nejmenším potřebném množství *dichlormethanu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a znovu se zaznamenají spektra se zbytky obou látek.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 20 mg *betamethasonu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *dexamethasonu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá vysušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Potom se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min při 120 °C nebo až do vzniku skvrn. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě skvrny, které nemusí být zcela odděleny.

D. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Po ochlazení se přidá 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do získání bezbarvé směsi a zfiltruje se. K čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanu-oxidu zirkoničitého RS* se přidá 1,0 ml filtrátu, promíchá se a nechá se 5 min stát. Současně se stejným způsobem připraví slepá zkouška. Roztok získaný se zkoušenou látkou je žlutý, roztok získaný slepou zkouškou je červený.

E. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a míchá se do rozpuštění. Během 5 min se objeví červenohnědé zabarvení. Přidá se 10 ml *vody R*; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +118° až +126°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,125 g v *methanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *betamethasonu CRL* a 2 mg *methylprednisolonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min s lineárním gradientovým programem za použití následujících podmínek:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (V/V)	Mobilní fáze B % (V/V)	Poznámky
0	100	0	izokraticky
15	100	0	počátek lineárního gradientu
40	0	100	konec chromatogramu, návrat na 100A
41	100	0	počátek ustalování s A
46 = 0	100	0	konec ustalování, počátek dalšího chromatogramu

- *mobilní fáze A* - v odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 250 ml *acetonitrilu R* se 700 ml *vody R*, nechá se ustálit, doplní se *vodou R* na 1000 ml a opět se promíchá,
- *mobilní fáze B - acetonitril R*,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje při 45 °C. Kolona se ustaluje s mobilní fází B při průtokové rychlosti 2,5 ml/min po dobu nejméně 30 min a potom s mobilní fází A po dobu 5 min. Pro následující chromatogramy se použijí podmínky popsané mezi 40 min až 46 min.

Zvolí se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu při nastříknutí 20 μl porovnávacího roztoku (b) činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a při zaznamenání chromatogramu za výše popsaných podmínek retenční časy látek jsou: methylprednisolonu asi 11,5 min a betamethasonu asi 12,5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky methylprednisolonu a betamethasonu je nejméně 1,5. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi A.

Nastříkne se odděleně po 20 μl směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* jako slepá zkouška, 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jeden takový pík má plochu větší, než je polovina hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %). K píkům ze slepé zkoušky a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b), se nepřihlíží.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238,5 nm.

Vypočítá se obsah $C_{22}H_{29}FO_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 395.

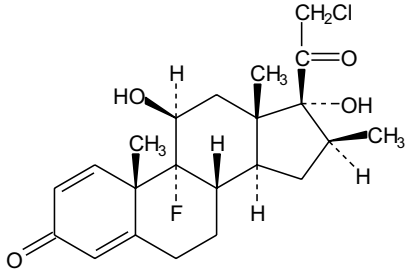
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

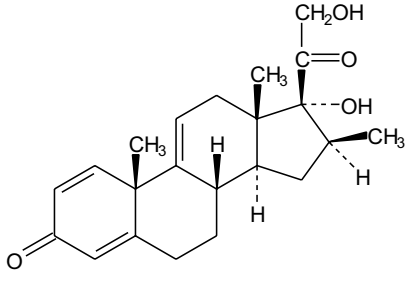
Separandum.

Nečistoty

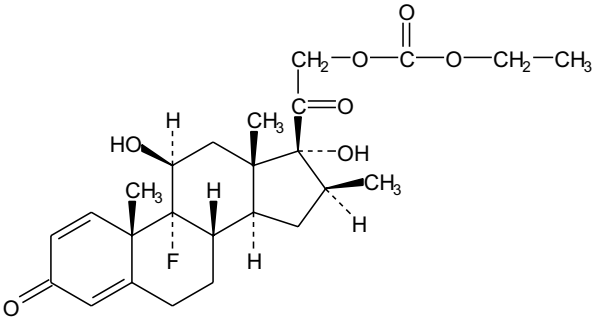
A. dexamethason,



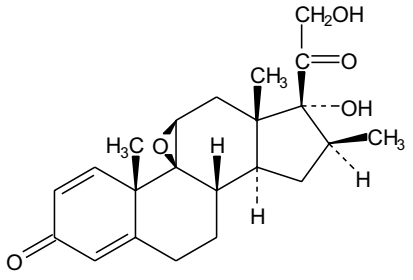
B. 9-fluor-11β,17-dihydroxy-21-chlor-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion,



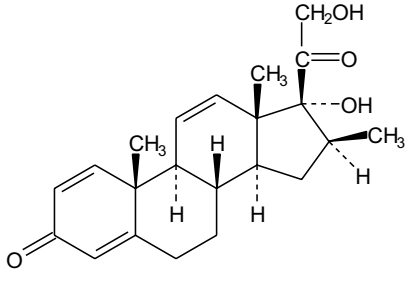
C. 17,21-dihydroxy-16β-methyl-1,4,9,(11)-pregnatrien-3,20-dion,



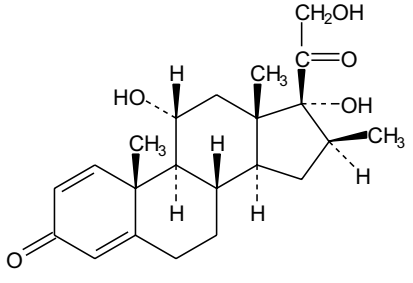
D. 21-ethoxykarbonyloxy-9-fluor-11β,17-dihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion,



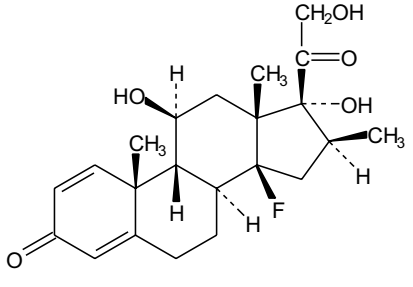
E. 9,11-epoxy-17,21-dihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion,



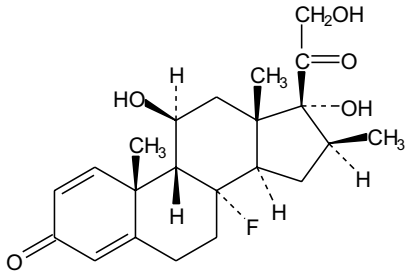
F. 17,21-dihydroxy-16β-methyl-1,4,11-pregnatrien-3,20-dion,



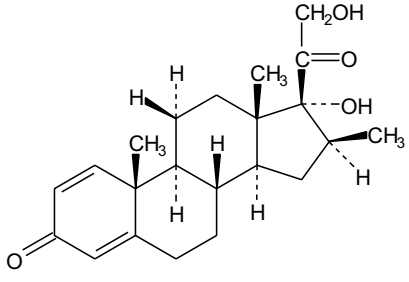
G. 11α,17,21-trihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion,



H. 14β-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16β-methyl-8α,9β-pregna-1,4-dien-3,20-dion,



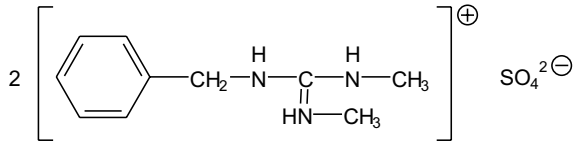
I. 8α-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16β-methyl-9β-pregna-1,4-dien-3,20-dion,



J. 17,21-dihydroxy-16β-methyl-1,4-pregnandien-3,20-dion.

† Betanidini sulfas

Betanidiniumsulfat



$C_{20}H_{32}N_6O_4S$ M_r 452,57 CAS 114-85-2

Je to bis(1-benzyl-2,3-dimethylguanidinium)sulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{32}N_6O_4S$.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50 mg se rozpustí ve 100 ml *vody R*. Absorpční spektrum *(2.2.25)* tohoto roztoku měřené v rozmezí 230 nm až 350 nm vykazuje absorpční maxima při 251 nm, 257 nm a 263 nm, z nichž absorpční maximum při 257 nm je nejintenzivnější.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *betanidiniumsulfatu CRL*. Látky se zkouší ve formě suspenze v *parafinu tekutém R* a spektra se porovnávají při vlnových délkách 2000 cm^{-1} až 600 cm^{-1}.

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 20 ml *trinitrofenolu RS*. Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje se *vodou R* a suší se 30 min při 80 °C; taje *(2.2.14)* při 147 °C až 152 °C.

D. Asi 25 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 1 ml *1-naftolu RS* a po kapkách za protřepávání 1 ml *chlornanu sodného RS*; vznikne světle růžová sraženina, která stáním přechází na fialově červenou.

E. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,2 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, zředí se jí na 10 ml a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; zbarvení roztoku se změní na červené. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 0,25 ml *červeně methylové RS*; zbarvení roztoku se změní na červené nebo oranžové.

Trimethylguanidin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok. 40 mg *betanidiniumsulfatu CRL* se rozpustí v 1,0 ml roztoku *trimethylguanidiniumsulfatu CRL* (3 mg/10 ml) v *methanolu R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R*, *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *ethylacetatu R* (10 + 16 + 24 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není skvrna odpovídající trimethylguanidinu intenzivnější než menší skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,75 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

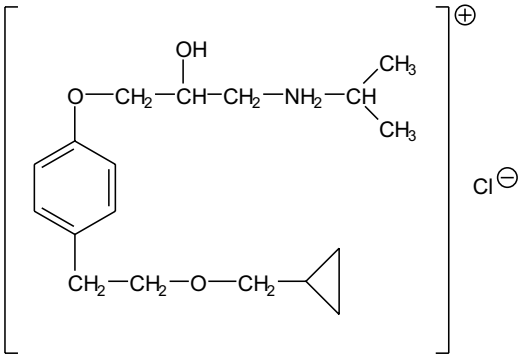
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 45,26 mg $C_{20}H_{32}N_6O_4S$.

Uchovávání

Separandum.

† Betaxololi hydrochloridum

Betaxololiumchlorid



$C_{18}H_{30}ClNO_3$ M_r 343,89 CAS 63659-19-8

Je to (*RS*)-N-isopropyl-3-{[4-[2-(cyklopropylmethoxy)ethyl]fenoxy]-2-hydroxy-1-propyl}amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{18}H_{30}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v dichlormethanu a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 113 °C až 117 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *betaxololiumchloridu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu oktadecylsilanizovaného pro chromatografii R* s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *betaxololiumchloridu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *oxprenololiumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny chloristé R*, *methanolu R* a *vody R* (0,5 + 50 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu

zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Potom se vrstva postříká roztokem *vanilinu R* (50 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R, kyseliny octové ledové R* a *methanolu R* (5 + 10 + 85), zahřívá se při 100 °C až 105 °C, až zbarvení skvrn dosáhne nejvyšší intenzity (10 min až 15 min), a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,20 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml. K roztoku se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je červený. Potom se přidá 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 8 mg zkoušené látky a 4 mg *betaxololu nečistoty A CRL* se rozpustí ve 20,0 ml mobilní fáze.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min připravené následujícím postupem: smíchá se 175 ml *acetonitrilu R* a 175 ml *methanolu R* a směs se zředí na 1 l roztokem *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (3,4 g/l), u kterého se předem upraví pH na hodnotu 3,0 *kyselinou fosforečnou R*,
- spektrofotometrického detektoru, 273 nm,
- dávkovací smyčky.

Nastříkne se odděleně po 20 µl všech roztoků. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající nejméně čtyřnásobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,3násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %) a součet takových ploch není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky betaxololu nečistoty A a betaxololu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 2,0. Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy píku porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 10 ml základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se zahřívá v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve směsi 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence do druhé inflexe.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,39 mg $C_{18}H_{30}ClNO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. *(RS)*-3-(4-ethylfenoxy)-1-isopropylamino-2-propanol,
B. *(RS)*-3-[4-(2-hydroxyethyl)fenoxy]-1-isopropylamino-2-propanol,
C. *(RS)*-[4-(2-cyklopropylmethoxyethyl)fenoxy]-2,3-epoxypropan,
D. 4-[2-(cyklopropylmethoxy)ethyl]fenol,
E. *(RS)*-3-[4-(2-butyloxyethyl)fenoxy]-1-isopropylamino-2-propanol.

Betulae folium

1998

List břízy

Synonyma: Folium betulae, Březový list

Je to celý usušený list nebo jeho úlomky druhu *Betula pendula* ROTH, *Betula pubescens* EHRH. a jejich kříženců.

Obsahuje nejméně 1,5 % flavonoidů, počítáno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$; M_r 464,4), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listy obou druhů na svrchní straně tmavě zelené, na spodní straně světlejší, šedozelené, s charakteristickou síťovitou žilnatinou. Žilky jsou světle hnědé až téměř bílé.

Betula pendula. List lysý, na obou stranách žláznatě tečkovaný. Je 3 cm až 7 cm dlouhý a 2 cm až 5 cm široký, dlouze řapíkatý. Čepel listu trojúhelníkovitá až kosníkovitá, zašpičatělá, na bázi široce klínovitá nebo uťatá, na okraji dvakrát pilovitá.

Betula pubescens. List menší, oválný až vejčitě kosníkovitý, krátce zašpičatělý, na obou stranách slabě pýřitý, s roztroušenými žláznatými chlupy. Na spodní straně listu v paždí žilek malé chomáčky žlutošedých chlupů. Čepel drsnější, na okraji pilovitá.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátuRS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky čepele s pokožkovými buňkami se stěnami rovnými a na spodní straně s anomocytickými průduchy *(2.8.3)*; štítovité žláznaté chlupy obvykle o průměru 100 μm až 150 μm; úlomky mezofylu s krystaly šťavelanu

vápenatého; úlomky cévních svazků a sklerenchymatická vlákna provázená komůrkovými vlákny. U druhu *Betula pubescens* kromě toho silně ztlustlé jednobuněčné krycí chlupy 80 μm až 600 μm dlouhé, obvykle však 100 μm až 200 μm dlouhé.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 1 mg *kyseliny chlorogenové R,* 1 mg *kyseliny kávové R,* 2,5 mg *rutinu R* a 2,5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *2-butanonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu, postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní polovině tři skvrny (v pořadí stoupající hodnoty R_F): žlutohnědá (rutin), světle modrá (kyselina chlorogenová) a žlutohnědá (hyperosid), v horní třetině chromatogramu je světle modrá skvrna (kyselina kávová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají tři skvrny (rutin, kyselina chlorogenová, hyperosid) polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrna odpovídající rutinu je jen velmi slabá, skvrna odpovídající hyperosidu je intenzivní. Blízko čela chromatogramu je červená skvrna (chlorofyly). Mezi touto skvrnou a polohou, která je vymezena skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku, je hnědožlutá skvrna (kvercetin).

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Nejvýše 3 % úlomků jehněd a nejvýše 3 % ostatních cizích příměsí.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 5,0 %.

Stanovení obsahu

Základní roztok. 0,200 g práškované drogy (355) se ve 100ml baňce smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Droga i chomáček vaty se vaří 10 min ještě dvakrát s 20 ml *acetonu R* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje filtračním papírem do téže odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce se zředí *acetonem R* předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethylacetatu R*. Spojené horní vrstvy se protřepávají dvakrát 50 ml *vody R* a zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do 50ml odměrné baňky. Roztok v baňce se zředí *ethylacetatem R* na 50,0 ml.

Zkoušený roztok. 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku *chloridu hlinitého RS* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% *(V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% *(V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1{,}25}{m},$$

v němž značí:
A - absorbanci roztoku v maximu při 425 nm,
m - navážku drogy v gramech.

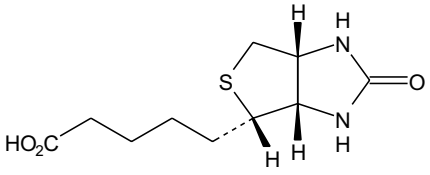
Specifická absorbance hyperosidu je 500.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Biotinum

Biotin



$C_{10}H_{16}N_2O_3S$ M_r 244,31 CAS 58-85-5

Je to kyselina 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]-4-imidazolyl]pentanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{16}N_2O_3S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *biotinu CRL.*

B. Zkouška Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) hlavní skvrna odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 10 mg se rozpustí zahřátím ve 20 ml *vody R.* Po ochlazení se smíchá s 0,1 ml *bromové vody R*; zbarvení bromové vody zmizí.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,250 g se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +89° až +93°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy vhodného silikagelu (5 μm). *Roztoky se připravují těsně před použitím a při zkoušce je nutno chránit je před světlem.*

Zkoušený roztok (a). 50 mg se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *biotinu CRL* se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 40 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny octové ledové R* a *toluenu R* (5 + 25 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a po ochlazení se postříká *4-dimethylaminocinnamaldehydem RS* a ihned se pozoruje v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna z takových skvrn je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 10 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se suspenduje v 5 ml *dimethylformamidu R*, přidá se 50 ml *ethanolu R,* a přestože zkoušená látka není rozpuštěna, titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,43 mg $C_{10}H_{16}N_2O_3S$.

Uchovávání

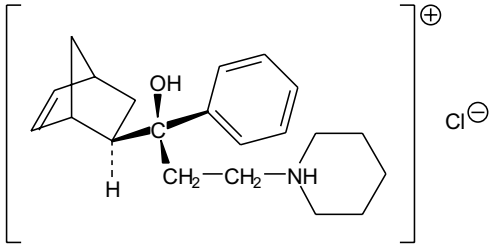
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

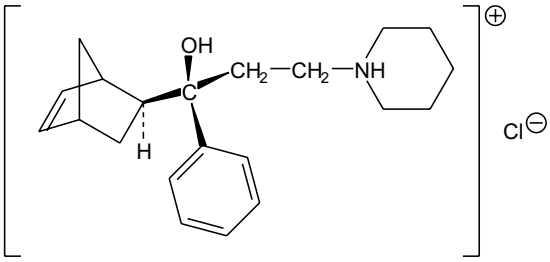
Nečistoty

A. kyselina bis{3-[(3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]propyl}octová,
B. kyselina4-[(3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]butan-1,1-dikarboxylová,
C. kyselina 5-(3,4-diamino-2-thienyl)pentanová,
D. kyselina 2-methyl-5-[(3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentanová,
E. kyselina 5-[(3*aS*,4*S*,6*aR*)-N-benzyl-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentanová.

† Biperideni hydrochloridum

Biperideniumchlorid





$C_{21}H_{30}ClNO$ M_r 347,93 CAS 1235-82-1

Je to (*RS*)-{3-[(1*RS*,2*SR*,4*RS*)-bicyklo[2,2,1]-5-hepten-2-yl]-3-fenyl-3-hydroxy-1-propyl}piperidiniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{30}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu a prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při teplotě asi 280 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *biperideniumchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *biperideniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *biperidenu nečistoty A CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 2 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R, methanolu R a toluenu R* (1 + 1 + 20) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* a potom *dusitanem sodným RS* a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. K asi 20 mg se přidá 5 ml *kyseliny fosforečné R*; vzniká zelené zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,10 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, je-li třeba mírným zahřátím, a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje itenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg zkoušené látky a 10 mg *biperidenu nečistoty A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 50 m a vnitřního průměru 0,25 mm, jejíž vnitřní povrch je pokryt filmem *poly(fenylmethylvinyl)siloxanu R* (tloušťka filmu 0,25 µm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 0,4 ml/min a dělicím poměru 1 : 250,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 200 °C, pak se zvyšuje rychlostí 2 °C/min až na 270 °C, teplota nástřikového prostoru je 250 °C a teplota detektoru je 300 °C.

Nastříknou se 2 µl porovnávacího roztoku (a) a 2 µl porovnávacího roztoku (b). Používá-li se zapisovač, nastaví se citlivost systému tak, aby výška dvou hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (biperiden) a druhým píkem (biperiden nečistota A) na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) není menší než 2,5 a poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) k šumu není menší než 6.

Nastříknou se 2 µl zkoušeného roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času biperideniumchloridu. Pro píky s relativním retenčním časem vztaženo k biperidenu 0,95 až 1,05: plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,5 % plochy hlavního píku a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,0 % plochy hlavního píku. Pro píky s relativním retenčním časem mimo toto rozmezí: plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,1 % plochy hlavního píku a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 0,5 % plochy hlavního píku. Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05 % plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 60 ml *lihu 96% R* a titruje se v uzavřené titrační baňce *hydroxidem draselným v lihu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,79 mg $C_{21}H_{30}ClNO$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

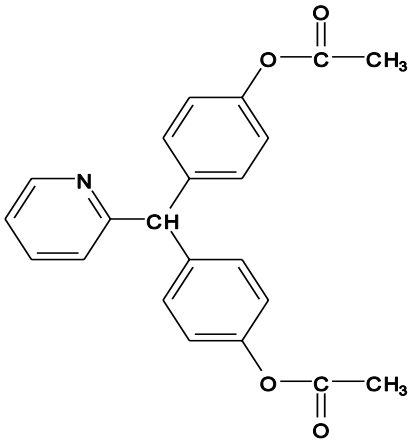
Separandum.

Nečistoty

A. *(SR)*-1-[(1*RS*,2*RS*,4*RS*)-bicyklo[2,2,1]hept-5-en-2-yl]-1-fenyl-3-(1-piperidyl)-1-propanol (endoforma),
B. *(SR)*-1-[(1*RS*,2*SR*,4*RS*)-bicyklo[2,2,1]hept-5-en-2-yl]-1-fenyl-3-(1-piperidyl)-1-propanol,
C. *(RS)*-1-[(1*RS*,2*SR*,4*RS*)-bicyklo[2,2,1]hept-5-en-2-yl]-1-fenyl-3-(1-piperidyl)-1-propanol,
D. 1-[(1*RS*,2*SR*,4*RS*)-bicyklo[2,2,1]hept-5-en-2-yl]-3-(1-piperidyl)-1-propanon,
E. 1-[(1*RS*,2*RS*,4*RS*)-bicyklo[2,2,1]hept-5-en-2-yl]-3-(1-piperidyl)-1-propanon.

† Bisacodylum

Bisakodyl



$C_{22}H_{19}NO_4$ M_r 361,40 CAS 603-50-9

Je to bis(4-acetoxyfenyl)-2-pyridylmethan. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{19}NO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 131 °C až 135 °C.

B. 10,0 mg se rozpustí v roztoku *hydroxidu draselného R* (6 g/l) v *methanolu R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *hydroxidu draselného R* (6 g/l) v *methanolu R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 248 nm a prodlevu při asi 290 nm. Specifická absorbance v maximu je 632 až 672.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *bisakodylu CRL*. Jestliže spektra zkoušené látky a referenční látky jsou rozdílná, rozpustí se oddělené obě látky v *chloroformu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, po postřiku směsí stejných objemových dílů *jodu 0,05 mol/l RS* a *kyseliny sírové zředěné RS*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pozoruje se v denním světle.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 1,0 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého RS*, protřepe se, směs se zahřeje k varu a po ochlazení se zfiltruje. K filtrátu se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *bisakodylu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *xylenu R* a *2-butanonu R* (50 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, je-li třeba, zahřeje se na 100 °C až 105 °C a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,14 mg $C_{22}H_{19}NO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Bismuthi subcarbonas

Zásaditý uhličitan bismutitý

Synonyma. Bismuthum carbonicum basicum, Bismuthum subcarbonicum

CAS 5892-10-4

Je to směs zásaditých uhličitanů bismutitých přibližného složení vyjádřeného vzorci $2(BiO)_2CO_3 \cdot H_2O$ a $(BiO)_2CO_3$. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 80,0 % až 82,5 % Bi (A_r 208,98).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se za šumění v minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkouškám na bismut *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se protřepe s 10 ml *vody R*, přidá se 20 ml *kyseliny dusičné R* a zahřátím se rozpustí. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Chloridy *(2.4.4)*. K 6,6 ml roztoku S se přidají 4 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 μg/g).

Dusičnany. K 0,25 g v kuželové baňce na 125 ml se přidá 20 ml *vody R* a 0,05 ml *indigokarmínu RS1*. Opatrně se najednou přidá 30 ml *kyseliny sírové R* a ihned se titruje *indigokarmínem RS1* do stálého modrého zbarvení. Spotřeba *indigokarmínu RS1* je nejvýše *n* ml; *n* ml odpovídá 1 mg NO_3 (0,4 %).

Alkalické kovy a kovy alkalických zemin. K 1,0 g se přidá 10 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny octové R*. 2 min se vaří a po ochlazení se zfiltruje. Zbytek na filtru se promyje 20 ml *vody R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 20 ml *vody R*. Směs se vaří za zavádění *sirovodíku R*, dokud již nevzniká sraženina, potom se zfiltruje a zbytek na filtru se promyje *vodou R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí a odpaří se na vodní lázni do sucha. Ke zbytku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, opatrně se vyžíhá, ochladí se a zváží. Zbytek váží nejvýše 10 mg (1,0 %).

Arsen *(2.4.2)*. K 0,5 g v destilační baňce se přidá 5 ml *vody R* a 7 ml *kyseliny sírové R*. Po ochlazení se přidá 5 g *směsi redukční R* a 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a obsah baňky se postupně během 15 min až 30 min zahřeje k varu. Dále se zahřívá tak, aby destilace probíhala stejnoměrně. Destiluje se, až se objem směsi v baňce zmenší na polovinu původního objemu, nebo 5 min od chvíle, kdy se vzdušný chladič naplní parami. Destilace se přeruší, jakmile se objeví páry oxidu sírového. Destilát se jímá do zkumavky obsahující 15 ml *vody R* chlazené ve vodě s ledem. Chladič se promyje *vodou R* a destilát se zředí *vodou R* na 25 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 2,5 ml základního *roztoku arsenu (1 μg As/ml)* a 22,5 ml *vody R*.

Měď. K 5 ml roztoku S se přidají 2 ml *amoniaku 17,5 % R,* zředí se *vodou R* na 50 ml a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 1 ml roztoku *diethyldithiokarbaminanu sodného R* (1 g/l). Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 0,25 ml základního *roztoku měďi (10 μg Cu/ml)* a 9,75 ml *vody R* (50 μg/g) místo 10 ml filtrátu.

Olovo. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 12,5 g se rozpustí v 75 ml směsi stejných objemových dílů *vody R* a *kyseliny dusičné prosté olova R*. Vaří se 1 min, ochladí se a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití odpovídajících množství porovnávacího roztoku olova a 37% (*V/V*) *kyseliny dusičné prosté olova R*.

Měří se absorbance při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

V závislosti na přístroji může být měření provedeno při 217,0 nm.

Stříbro. K 2,0 g se přidá 1 ml *vody R* a 4 ml *kyseliny dusičné R*. Opatrně se zahřívá až do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 11 ml. Po ochlazení se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a směs se nechá 5 min stát chráněna před světlem. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití směsi 10 ml základního *roztoku stříbra (5 μg Ag/ml)*, 1 ml *kyseliny dusičné R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* (25 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 250 ml. Provede se chelatometrická titrace bismutu *(2.5.11)*.

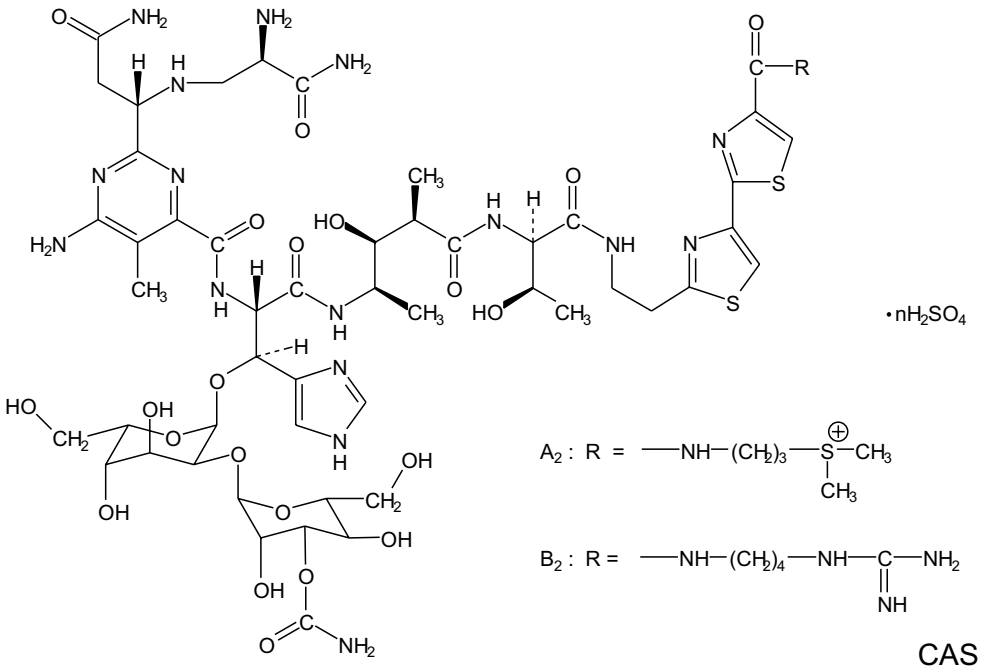
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,90 mg Bi.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

†† Bleomycini sulfas

Bleomyciniumsulfat



CAS 9041-93-4

Je to síran směsi glykopeptidů produkovaných mikroorganismem *Streptomyces verticillus* nebo získaný jinými způsoby; dvě hlavní složky směsi jsou N^1-[3-(dimethylsulfonio)propyl]bleomycinamid (bleomycin A_2) a 4-(guanidinobutyl)bleomycinamid (bleomycin B_2). Účinnost je nejméně 1500 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý velmi hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v acetonu a etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Na chromatogramu zkoušeného roztoku ze zkoušky Složení, viz Zkoušky na čistotu, jsou retenční časy a velikosti dvou hlavních píků shodné s retenčními časy a velikostmi hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

B. Vyhovuje zkoušce na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,200 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) při 430 nm není větší než 0,10.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,0. Měří se roztok připravený rozpuštěním 50 mg ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Složení. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *bleomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml
Porovnávací roztok (b). 1,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (7 μm),
- gradientové eluce mobilní fází, která má průtokovou rychlost 1,2 ml/min a kterou na začátku tvoří 10 % (*V/V*) *methanolu R* a 90 % (*V/V*) směsi připravené takto: 0,960 g *pentansulfonanu sodného R* se rozpustí v 900 ml roztoku *kyseliny octové R* (4,8 g/l $C_2H_4O_2$), přidá se 1,86 g *edetanu disodného R*, zředí se stejným rozpouštědlem na 1000 ml a pH se upraví *amoniakem 17,5% R* na hodnotu 4,3; během 60 min se podíl methanolu zvyšuje na 40 % (*V/V*) a při tomto složení mobilní fáze se pokračuje ještě asi 20 min, dokud není eluován demethylbleomycin A_2 (retenční čas 1,5 až 2,5, vztaženo na bleomycin A_2),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 5. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže poměr signálu hlavního píku k šumu je nejméně 20. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku nejvýše 2 %.

Nastříkne se zkoušený roztok. Složení počítané postupem vnitřní normalizace bez přihlédnutí k plochám píků menším než 0,1 % z celkové plochy je: bleomycin A_2 (první hlavní pík) 55 % až 70 %; bleomycin B_2 (druhý hlavní pík) 25 % až 32 %; součet bleomycinu A_2 a bleomycinu B_2 je nejméně 85 %; obsah demethylbleomycinu A_2 (retenční čas vzhledem k bleomycinu A_2 je 1,5 až 2,5) není větší než 5,5 %; obsah ostatních příbuzných látek není větší než 9,5 %.

Měď. Nejvýše 200 μg/g Cu; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I.*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml základního roztoku mědi *(10 μg Cu/ml)* se zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Měří se absorbance při 324,7 nm za použití měděné lampy s dutou katodou a plamene vzduch--acetylen.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 3,0 %; 50 mg se suší 3 h při 60 °C a tlaku nepřekračujícím 670 Pa.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) difuzní metodou za použití *bleomyciniumsulfatu CRL* jako referenční látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Venenum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

A. kyselina bleomycinová (R= -OH),
B. bleomycin A_5 (R= $-NH-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$),
C. bleomycin B_4 (R= $-NH-(CH_2)_4-NH-C(=NH)-NH-(CH_2)_4-NH-C(=NH)-NH_2$),
D. demethylbleomycin A_2 (R= $-NH-(CH_2)_4-S-CH_3$).

Boldo folium

N

Boldovníkový list

Synonymum. Folium boldo

Je to usušený list druhu *Peumus boldus* MOLINA. Obsahuje nejméně 20 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga výrazného aromatického pachu, kořenité chuti.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. List krátce řapíkatý, oválný až vejčitě oválný, 3 cm až 7 cm dlouhý a až 3 cm široký, kožovitý, zelenošedý až stříbřitě zelený, s čepelí podvinutou, na svrchní straně více, na spodní straně méně výrazně bradavčitou. Žilnatina na spodní straně listu vyniklá.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka z drobných, výrazně ztlustlých buněk krytých silnou kutikulou. Na bradavčité vychlípeniny pokožky nasedají hvězdovité krycí chlupy s pěti až osmi jednobuněčnými ztlustlými rameny. Na spodní straně listu anomocytické průduchy (*2.8.3*). Hypodermis kolenchymatická jednořadá až dvouřadá, v bradavčitých vychlípeninách až šestiřadá. List bifaciální. Palisádový parenchym nejvýše dvouřadý s malými intercelulárami, houbový parenchym víceřadý s velkými intercelulárami. V mezofylu četné okrouhlé siličné buňky a zejména v blízkosti žilnatiny až 10 μm dlouhé jehlicovité krystaly šťavelanu vápenatého. Kolaterální svazky cévní provázeny dvěma pruhy kolenchymu.

C. Práškovaná droga. Prášek je šedozelený až hnědozelený. Droga je charakteristická těmito znaky: ztlustlé hvězdovité chlupy a jejich úlomky; úlomky bradavčité pokožky z buněk výrazně ztlustlých; úlomky kolenchymatické hypodermis a mezofylu s četnými siličnými buňkami a krystaly šťavelanu vápenatého.

D. 2,0 g práškované drogy (355) se protřepávají 5 min s 10,0 ml *lihu R* 80% *(V/V)*, výluh se zfiltruje. K 0,1 ml filtrátu se přidají 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí v 5,0 ml *vody R* a zfiltruje se do zkumavky. K filtrátu se přidá 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 0,3 ml *tetrajodortuťnatanu draselného RS*; vznikne intenzivní zákal (alkaloidy).

E. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. Zbytek filtrátu ze zkoušky totožnosti D se odpaří na vodní lázni asi na 2 ml, smíchá se s 8 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l RS* a tekutina se zfiltruje do dělicí nálevky na 150 ml. Roztok v dělicí nálevce se zalkalizuje *amoniakem 26% R* (na papír lakmusový) a protřepe se dvakrát 25 ml *chloroformu R*. Spojené spodní vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R,* zfiltrují se a baňka i filtr se promyjí malým množstvím *chloroformu R*. Roztok se odpaří na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí v 1 ml směsi objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* (1 + 1).

Na vrstvu předem rovnoměrně postříkanou 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a vysušenou v sušárně při 100 °C až 105 °C se nanese do pruhu (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (3 + 7) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm; na chromatogramu jsou patrny modré a modrofialové skvrny (alkaloidy). Vrstva se postříká roztokem *modři pravé B R* (2 g/l); na chromatogramu jsou patrny intenzivně červenofialové skvrny (alkaloidy).

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 8 % jiných částí matečné rostliny.

Záměny. V droze nejsou přítomny větší oválné listy s vlnitě zprohýbaným okrajem, na spodní straně šedé nebo nahnědle načervenalé. Hvězdovité chlupy chybějí, hypodermis jednovrstevná (*Cryptocaria peumus* NEES.).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 8,0 %.

Stanovení obsahu

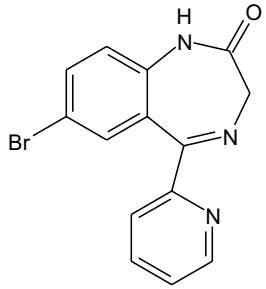
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*) s 5,0 g drogy v baňce na 500 ml, se 200 ml *vody R* jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.* Destiluje se 2 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

§ Bromazepamum

Bromazepam



$C_{14}H_{10}BrN_3O$ M_r 316,16 CAS 1812-30-2

Je to 7-brom-2,3-dihydro-5-pyrid-2-yl-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{10}BrN_3O$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 233 nm, prodlevu při asi 260 nm a může vykazovat širší absorpční maximum při asi 325 nm. Specifická absorbance v maximu při 233 nm je 980 až 1080.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *bromazepamu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s flourescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *bromazepamu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *bromazepamu CRL* a 10 mg *temazepamu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *etheru R* (30 + 70) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného

roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

D. Asi 20 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *vody R* a 1 ml roztoku *síranu amonno-železitého R* (10 g/l); vzniká fialové zbarvení.

E. K 0,15 g v porcelánovém kelímku se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a zahřívá se 10 min nad plamenem. Nechá se vychladnout, zbytek se převede do 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tetrahydrofuranu R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 20 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Roztoky se připraví těsně před použitím a zkouška se provede za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.

Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 20 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R, triethylaminu R, dichlormethanu R* a *etheru petrolejového R1* (5 + 5 + 20 + 70) po dráze 7,5 cm. Vrstva se suší 20 min v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,2 %; 1,000 g se suší 4 h při 80 °C a při tlaku nepřevyšujícím 2,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

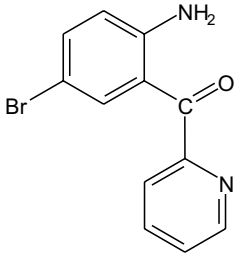
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,62 mg $C_{14}H_{10}BrN_3O$.

Uchovávání

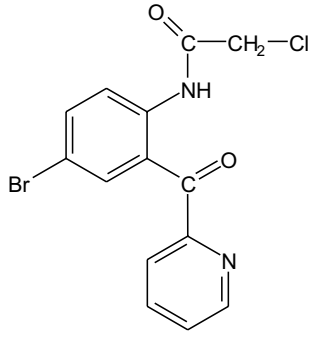
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

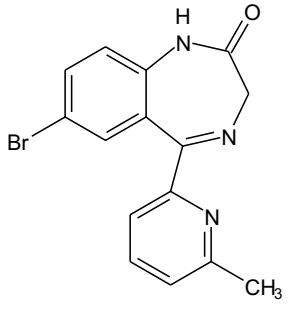
Nečistoty



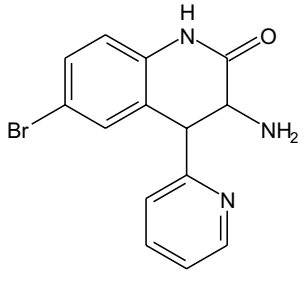
A. 2-amino-5-bromfenyl(2-pyridyl)keton,



B. N-[4-brom-2-(2-pyridylkarbonyl)fenyl-2-chloracetamid,



C. 7-brom-2,3-dihydro-5-[2-(6-methylpyridyl]-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-on,

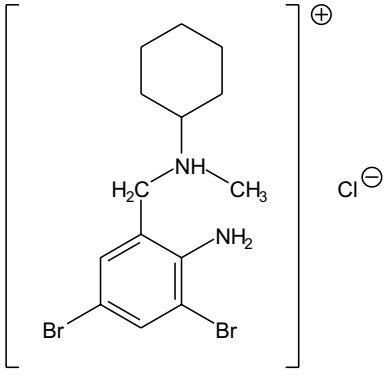


D. 3-amino-6-brom-1,2-dihydro-4-(2-pyridyl)chinolinon.

† Bromhexini hydrochloridum

Bromhexiniumchlorid

Synonymum. Bromhexinium chloratum



$C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$ M_r 412,59 CAS 611-75-6

Je to N-(2-amino-3,5-dibrombenzyl)-N-methylcyklohexylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *bromhexiniumchloridu CRL*. Jestliže spektra zkoušené látky a referenční látky jsou rozdílná, rozpustí se odděleně obě látky v nejmenším potřebném množství *methanolu R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Se zbytky se připraví tablety s halogenidovou solí a spektra se zaznamenají znovu.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

C. Asi 25 mg se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 50 ml *vody R*. Potom se přidají 2 ml *dichlormethanu R* a 5 ml *chloraminu T RS* a protřepe se; spodní vrstva se zbarví hnědožlutě.

D. Asi 1 mg se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*. Takto připravený roztok vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy *(2.3.1)*.

E. Asi 20 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R* a přidá se 1 ml *vody R*. Takto připravený roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF* $_{254}$ *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 7,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *bromhexiniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, vody R* a *1-butanolu R* (17 + 17 + 66) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je zřetelně viditelná skvrna.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 70 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

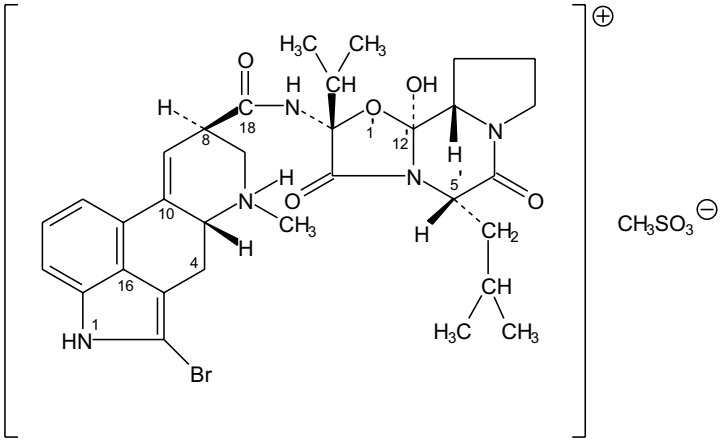
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,26 mg $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Bromocriptini mesilas

Bromokriptiniummesilat



$C_{33}H_{44}BrN_5O_8S$ M_r 750,70 CAS 22260-51-1

Je to bromokriptiniummethansulfonat, tj. (5′*S*)-2-brom-12′-hydroxy-5′-isobutyl-2′-isopropyl--3′,6′,18-ergotamantrion-methansulfonat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{33}H_{44}BrN_5O_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě zbarvený jemný krystalický prášek. Je velmi citlivý na světlo, prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu a stanovení obsahu se provádějí co nejrychleji a za chránění před světlem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 200,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 380 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 305 nm a minimum při 270 nm. Specifická absorbance v maximu je 120 až 135, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *bromokriptiniummesilatu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 g se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS,* asi 5 min se třepe, zfiltruje se a přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1*; filtrát zůstne čirý. K další 0,1 g se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, promíchá se a žíhá do vzniku bílého zbytku. Po vychladnutí se zbytek rozpustí v 7 ml *vody R*, roztok (a), uchová se také pro zkoušku E. Roztok (a) vyhovuje zkoušce na sírany (a) *(2.3.1)*.

E. Roztok (a) ze zkoušky D vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevné roztoky H_5, $HŽ_5$ nebo $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,1 až 3,8; měří se roztok připravený takto: 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *vody prosté oxidu uhličitého R* (2 + 8) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +95° až +105°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředěním stejnou směsí na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkoušené roztoky a porovnávací roztoky se připraví bezprostředně před použitím. Zkoušený roztok (a) se nanáší jako poslední.*

Roztoky se připraví za použití rozpouštědlové směsi, kterou je směs objemových dílů *methanolu R*, *lihu 96% R* a *dichlormethanu R* (3 + 3 + 4).

Zkoušený roztok (a). 20 mg se rozpustí ve 2 ml rozpouštědlové směsi.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí rozpouštědlovou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *bromokriptiniummesilatu CRL* se rozpustí v rozpouštědlové směsi a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí rozpouštědlovou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí rozpouštědlovou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 5 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí rozpouštědlovou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese do 10mm proužků po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, vody R, 2-propanolu R, dichlormethanu R* a *etheru R* (0,1 + 1,5 + 3 + 88 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se 2 min suší v proudu studeného vzduchu, postříká se *molybdenanem amonným RS3* a zahřívá se při 100 °C do objevení proužků skvrn (asi 10 min). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %) a nejvýše jedna taková skvrna může být intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %) a další taková skvrna může být intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 0,500 g se suší ve vakuu při 80 °C po dobu 5 h.

Stanovení obsahu

0,5000 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové ledové R* a 70 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 75,07 mg $C_{33}H_{44}BrN_5O_8S$.

Uchovávání

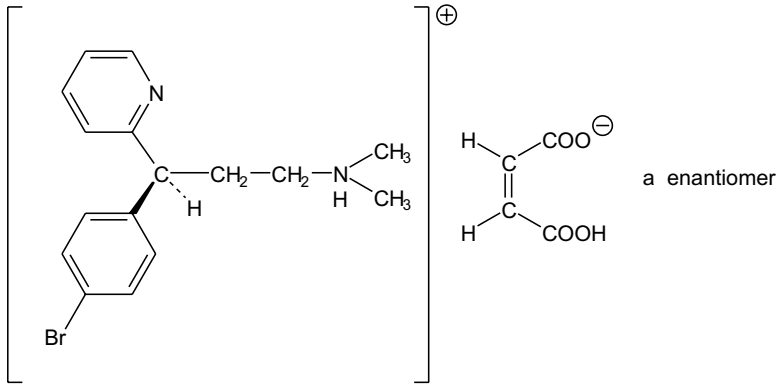
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující -15 °C. Separandum.

† Brompheniramini hydrogenomaleas

1998

Bromfeniraminiumhydrogenmaleinat

Synonymum. Brompheniramini maleas



$C_{20}H_{23}BrN_2O_4$ M_r 435,32 CAS 980-71-2

Je to (*R*,*S*)-[3-(4-bromfenyl)-3-(2-pyridyl)propyl]dimethylamonium(*Z*)-butendioat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{23}BrN_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, v methanolu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B, C, D a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 130 °C až 135 °C.

B. 65 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 320 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 265 nm. Specifická absorbance v maximu je 190 až 210.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *bromfeniraminiumhydrogenmaleinatu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

D. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku se retenčním časem a velikostí shoduje s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Chromatogram porovnávacího roztoku (c) vykazuje dva hlavní píky s retenčními časy odpovídajícími retenčním časům píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

E. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 m.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5,0 ml.
Porovnávací roztok. 56 mg *kyseliny maleinové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 ml obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *diisopropyletheru R* (3 + 7 + 20 + 70) po dráze 12 cm. Vrstva se suší několik minut v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny. Horní skvrna se shoduje polohou a velikostí se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

F. K 0,15 g v porcelánovém kelímku se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a žíhá se 10 min nad plamenem. Po vychladnutí se zbytek po spálení převede do 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,20 g ve 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,2° až +0,2°; měří se roztok v trubici délky 2 dm připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R*.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *bromfeniraminiumhydrogenmaleinatu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 1 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *chlorfenaminiummaleinatu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 1 ml.
Porovnávací roztok (c). K 0,5 ml zkoušeného roztoku se přidá 0,5 ml porovnávacího roztoku (b).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2,3 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné kysele a zásaditě promytou *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (135 μm až 175 μm), impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 205 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 250 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) rozlišení mezi píkem odpovídajícím bromfeniraminu a píkem

odpovídajícím chlorfenaminu není menší než 1,5. Po nástřiku zkoušeného roztoku se zaznamenávají chromatogramy po dobu odpovídající nejméně 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1 % plochy hlavního píku; žádný pík, kromě hlavního píku, nemá plochu větší než 0,4 % plochy hlavního píku. K píkům s plochou menší, než je 0,1 % plochy píku bromfeniraminu na chromatogramu zkoušeného roztoku, se nepřihlíží.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,260 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

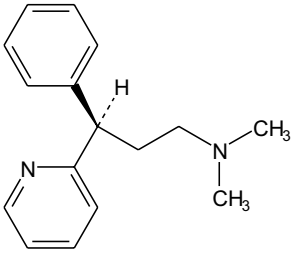
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,77 mg $C_{20}H_{23}BrN_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. chlorfenamin,
B. dexchlorfeniramin,

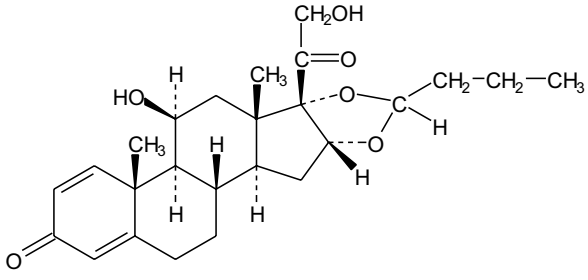


a enantiomer

C. (3*RS*)-N,N-dimethyl-3-fenyl-3-(2-pyridyl)propan-1-amin.

† Budesonidum

Budesonid



$C_{25}H_{34}O_6$ M_r 430,5 CAS 51333-22-3

Je to směs epimerů C-22*S* (epimer A) a C-22*R* (epimer B) 16α,17α-butylidendioxy-11β,21--dihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dionu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{25}H_{34}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *budesonidu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *budesonidu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 12,5 mg *triamcinolonacetonidu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, barvou v denním světle a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové R.* Během 5 min se objeví žluté zbarvení. Do 30 min se barva změní na hnědou nebo červenohnědou. Roztok se opatrně přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; barva vybledne a roztok zůstane čirý.

D. Asi 1 mg se rozpustí ve 2 ml roztoku obsahujícího 2 g *kyseliny fosfomolybdenové R* rozpuštěné ve směsi 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS,* 15 ml *vody R* a 25 ml *kyseliny octové ledové R.* Zahřívá se 5 min na vodní lázni, pak se 10 min ochlazuje v ledové vodě a přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* roztok je modrý.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška píku epimeru B (první ze dvou hlavních píků) na chromatogramu činila nejméně 50 % celého rozsahu zapisovače. Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu 1,5násobku retenčního času epimeru B. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě píků odpovídajících epimeru A a epimeru B, větší než součet ploch píků epimerů na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech takových píků není větší než součet ploch píků epimerů na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek součtu ploch píků epimerů na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Epimer A. Zkouší se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku. Obsah epimeru A (druhý pík) je 40,0 % až 51,0 % součtu ploch píků obou epimerů budesonidu.

Methanol. Nejvýše 0,1 %, stanoví se head-space plynovou chromatografií metodou standardního přidání (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 2,000 g zkoušené látky se rozpustí v *dimethylacetamidu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,500 g *methanolu R* se rozpustí v *dimethylacetamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Obvykle se používají následující head-space podmínky:
- teplota pro ustavení rovnováhy: 80 °C,
- doba pro ustavení rovnováhy: 30 min,
- teplota přenosové kapiláry: 85 °C,
- doba tlakování: 10 s,
- délka nástřiku: 10 s.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm pokryté vrstvou *makrogolu 20 000 R* (tloušťka filmu 1 µm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při tlaku 55 kPa,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min při 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min na 220 °C a 2 min se udržuje při 220 °C; teplota nástřikového prostoru je 250 °C a teplota detektoru 300 °C.

Ztráta sušením (2.2.32). Nejvýše 0,5 %. 1,000 g se zahřívá v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Roztoky je nutno během zkoušky chránit před světlem.*

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v 15 ml *acetonitrilu R* a zředí se *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 3,2* na 50,0 ml. Před použitím se nechá nejméně 15 min stát.

Porovnávací roztok (a). 15,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 25,0 mg *budesonidu CRL* se rozpustí v 15 ml *acetonitrilu R* a zředí se *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 3,2 na 50,0 ml.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 3,2* (32 + 68), s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 240 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška píku epimeru B (první ze dvou hlavních píků) na chromatogramu činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Pokud jsou chromatogramy zaznamenávány za předepsaných podmínek, je retenční čas epimeru B přibližně 16 min. Jestliže je třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi (se zvyšující se koncentrací se snižuje retenční čas).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je rozlišení mezi píky epimeru A a epimeru B nejméně 1,5; počet teoretických pater určených pro epimer B je nejméně 4000; faktor symetrie téhož píku je menší než 1,5.

Šestkrát se nastříkne 20 µl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka součtu ploch píků obou epimerů je nejvýše 1,0 %.

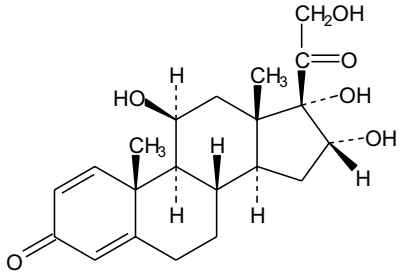
Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztok (c).

Vypočítá se procentuální obsah $C_{25}H_{34}O_6$ ze součtu ploch píků obou epimerů.

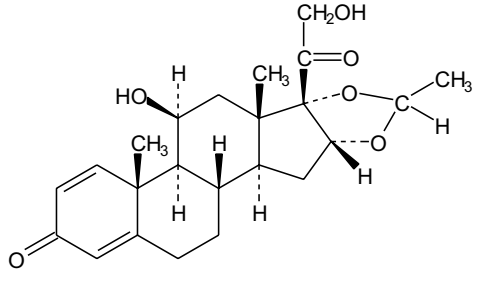
Uchovávání

Separandum.

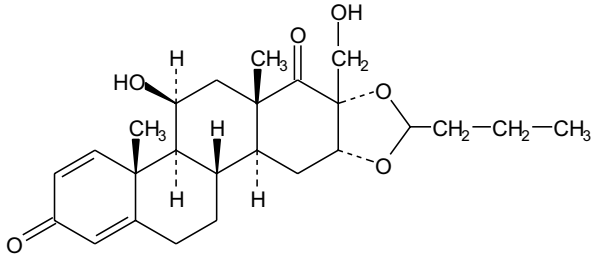
Nečistoty



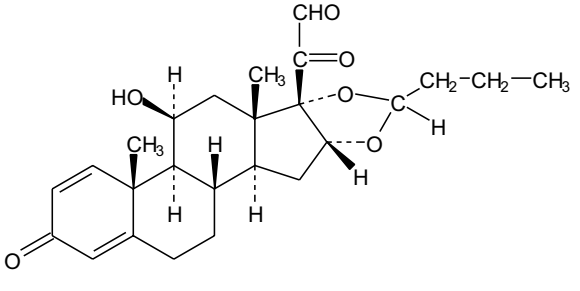
A. 11β,16α,17,21-tetrahydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion (16α-hydroxyprednisolon),



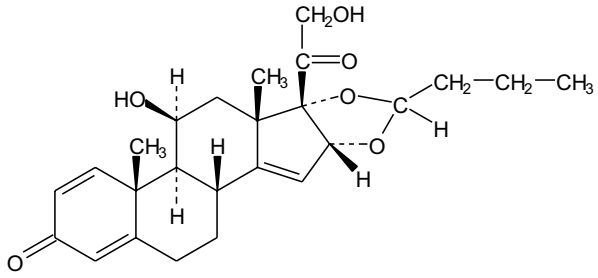
B. 16α,17-ethylidendioxy-11β,21-dihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion (22-methylhomologbudesonidu),



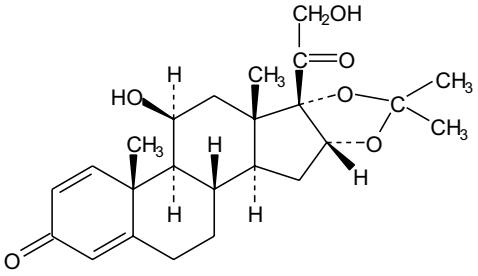
C. 16α,17α-butylidendioxy-11β-hydroxy-17α-(2-hydroxymethyl)-1,4-D-homoandrostadien-3,17-dion (D-homobudesonid),



D. 16α,17α-butylidendioxy-11β-hydroxy-3,20-dioxo-1,4-pregnadien-21-al (21-dehydrobudesonid),



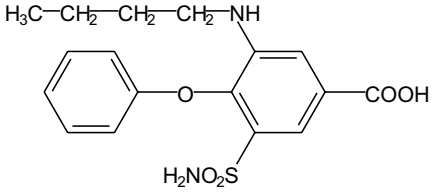
E. 16α,17α-butylidendioxy-11β,21-dihydroxy-1,4,14-pregnatrien-3,20-dion (14,15-dehydrobudesonid),



F. 16α,17α-methylethylidendioxy-11β,21-dihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion (desonid).

† Bumetanidum

Bumetanid



$C_{17}H_{20}N_2O_5S$ M_r 364,42 CAS 28395-03-1

Je to kyselina 3-butylamino-4-fenoxy-5-sulfamoylbenzoová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_{17}H_{20}N_2O_5S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Vykazuje polymorfismus.

Taje při asi 233 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,100 g se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *hydroxidu sodného R* (4 g/l) na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 210 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 224 nm a při 320 nm a prodlevu při 255 nm až 265 nm. Specifická absorbance v maximu při 224 nm je 720 až 760.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *bumetanidu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *acetonu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 20 mg se přidá 0,1 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, přidá se 0,1 ml *vody R* a zahřeje se; vyvíjejí se páry amoniaku, které barví *papír lakmusový červený R* na modro.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v roztoku *hydroxidu draselného R* (6 g/l) a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *bumetanidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R, kyseliny octové ledové R, cyklohexanu R* a *dichlormethanu R* (2,5 + 10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %) a nejvýše tři takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,1 ml *červeně fenolové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku fialově červeného zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,44 mg sloučeniny $C_{17}H_{20}N_2O_5S$.

Uchovávání

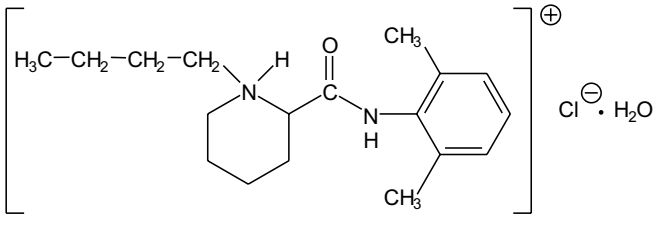
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. kyselina 4-fenoxy-3-nitro-5-sulfamoylbenzoová,
B. kyselina 3-amino-4-fenoxy-5-sulfamoylbenzoová,
C. butyl-3-(butylamino)-4-fenoxy-5-sulfamoylbenzoat,
D. kyselina 3-(2-ethylhexylamino)-4-fenoxy-5-sulfamoylbenzoová.

† Bupivacaini hydrochloridum

Bupivakainiumchlorid



$C_{18}H_{29}ClN_2O \cdot H_2O$ M_r 342,91 CAS 14252-80-3
M_r bezvodého 324,89

Je to monohydrát (*RS*)-1-butyl-2-(karboxamido-2′,6′-dimethylfenyl)piperidiniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{29}ClN_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 254 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *bupivakainiumchloridu CRL.* Měří se suspenze látek v *parafinu tekutém R*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a směs se protřepe dvakrát 15 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Ether se odpaří a zbytek se překrystalizuje z *lihu R* 90% *(V/V)* a vysuší se za sníženého tlaku. Krystaly tají *(2.2.14)* při 105 °C až 108 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* pH tohoto roztoku *(2.2.3)* není menší než 4,7. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; pH roztoku není větší než 4,7.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *bupivakainiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (0,1 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

2,6-Dimethylanilin. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (10 g/l) v *methanolu R* a 2 ml *kyseliny octové ledové R* a nechá se 10 min stát; případné žluté zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 2 ml roztoku *2,6-dimethylanilinu R* (5 mg/l) v *methanolu R* (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok olova (1 μg Pb/ml) se připraví zředěním základního *roztoku olova* (*100 μg Pb/ml*) směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (15 + 85).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 4,5 % až 6,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 25 ml *lihu 96% R* a 20 ml *vody R*. Přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

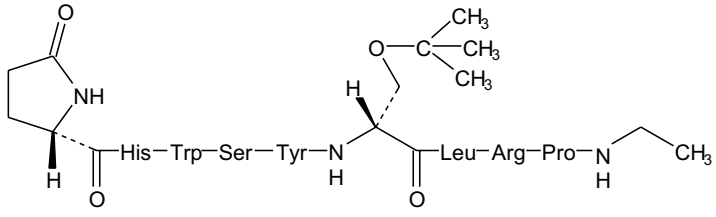
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,49 mg $C_{18}H_{29}ClN_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Buserelinum

Buserelin



$C_{60}H_{86}N_{16}O_{13}$ M_r 1239,44 CAS 57982-77-1

Je to syntetický nonapeptid obdobný lidskému gonadotropin-uvolňujícímu hormonu GnRH s agonistickou aktivitou ke gonadorelinu. Získává se chemickou syntézou a používá se jako acetat. Počítáno na bezvodou a kyseliny octové prostou látku, obsahuje 95,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{60}H_{86}N_{16}O_{13}$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý hygroskopický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a ve zředěných kyselinách.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku přibližně odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

B. ^{1}H nukleární magnetické rezonanční spektrum (*2.2.33*) roztoku zkoušené látky (4 mg/ml) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové deuterované R* a *deuteriumoxidu R* (20 + 80) kvalitativně odpovídá *referenčnímu spektru buserelinu Ph. Eur.*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Roztok zkoušené látky (10 g/l) je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická absorbance (*2.2.25*). 10,0 mg se rozpustí ve 100,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS.* Specifická absorbance v maximu při 278 nm je 49 až 56, počítáno na bezvodou látku prostou kyseliny octové.

Aminokyseliny. Zkouší se s použitím analyzátoru aminokyselin. Přístroj se kalibruje směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a L-forem následujících aminokyselin:

lysin	threonin	alanin	leucin
histidin	serin	valin	tyrosin
kyselina aspartová	arginin	methionin	fenylalanin
kyselina glutamová	prolin	isoleucin	

a polovinu ekvimolárního množství L-cystinu. Pro validaci metody se používá vhodný vnitřní standard, jako je D,L-norleucin.

Zkoušený roztok. 1,0 mg zkoušené látky se umístí do vhodné, důkladně vyčištěné zkumavky z tvrdého skla, délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Přidá se vhodné množství roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 50% (*V/V*). Zkumavka se ponoří do mrazicí směsi o teplotě -5 °C, tlak se sníží pod 133 Pa a zkumavka se utěsní. Zahřívá se 16 h při 110 °C až 115 °C. Ochladí se, zkumavka se otevře a obsah se přenese do 10ml baňky pomocí pěti dávek, každé po 0,2 ml, *vody R* a odpaří se do sucha za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R*. Tento postup se jednou zopakuje. Zbytek se přenese do tlumivého roztoku vhodného pro analyzátor aminokyselin a zředí se jím na vhodný objem.

Do analyzátoru aminokyselin se aplikuje vhodný, přesně změřený objem zkoušeného roztoku tak, aby výška píku odpovídající aminokyselině přítomné v největším množství zaujímala většinu celého rozsahu stupnice zapisovače.

Obsah každé aminokyseliny se vyjádří v molech. Relativní poměry aminokyselin se vypočítají tak, že jedna šestina součtu látkového množství molů kyseliny glutamové, histidinu, tyrosinu, leucinu, argininu a prolinu se položí rovna jedné. Hodnoty se nalézají v následujících limitech: serin 1,4 až 2,0; prolin 0,8 až 1,2; kyselina glutamová 0,9 až 1,1; leucin 0,9 až 1,1; tyrosin 0,9 až 1,1; histidin 0,9 až 1,1 a arginin 0,9 až 1,1. Ostatní aminokyseliny s výjimkou tryptofanu jsou přítomny nejvýše ve stopových množstvích.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -49° až -58°, počítáno na bezvodou látku prostou kyseliny octové. Měří se roztok zkoušené látky (10 g/l).

Kyselina octová. 3,0 % až 7,0 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *kyseliny propionové R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. Připraví se roztok *kyseliny propionové R* 0,1% (*V/V*) ve *vodě R*.
Zkoušený roztok. 15,0 mg zkoušené látky a 400,0 mg roztoku vnitřního standardu se postupně přenese do malé lahvičky. Přidá se 0,6 ml *vody R*, 1,0 ml *tlumivého roztoku o pH 3,0* a 30 µl *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a promíchá se.
Porovnávací roztok. 100,0 mg *kyseliny octové R* se naváží do 100ml odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 100,0 ml a promíchá se.

Do malé lahvičky se postupně naváží 600,0 mg tohoto roztoku a 400,0 mg roztoku vnitřního standardu. Přidá se 1,0 ml *tlumivého roztoku o pH 3,0* a promíchá se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,2 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné kysele pranou *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (150 µm až 180 µm), impregnovanou *4% polysorbatem 80 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtoku 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 130 °C, nástřikového prostoru na 150 °C a detektoru na 200 °C.
Nastříkne se 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Příbuzné peptidy. Zkouší se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (c). Chromatogram se zaznamenává po dobu přibližně dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) byla 50 % až 70 % celého rozsahu stupnice zapisovače. Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha

žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než trojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (3,0 %) a součet takových ploch píků, kromě hlavního píku, není větší než pětinásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5,0 %).

Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 80,0 mg zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 55,5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 5,0 mg se rozpustí v 5,0 ml mobilní fáze.
Porovnávací roztok (a). Obsah lahvičky *D-His-buserelinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi. Příslušný objem tohoto roztoku se zředí mobilní fází tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. 1,0 ml zkoušeného roztoku se přidá k 1,0 ml tohoto roztoku.

Porovnávací roztok (b). Obsah lahvičky *buserelinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi. Příslušný objem tohoto roztoku se zředí mobilní fází tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí 200 ml *acetonitrilu R* a 700 ml roztoku kyseliny fosforečné R (11,2 g/l) při průtoku 0,8 ml/min. Hodnota pH směsi se upraví *triethylaminem R* na 2,5,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky D-His-buserelinu a buserelinu je nejméně 1,5.

Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b).

Obsah zkoušené látky se vypočte z ploch píků na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a deklarovaného obsahu *buserelinu CRL.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí, při teplotě 2 °C až 8 °C. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

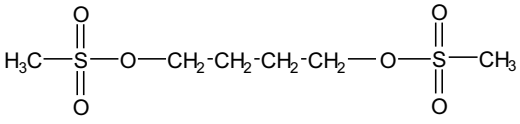
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- hmotnost peptidu v obalu,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů,
- zda je látka sterilní.

†† Busulfanum

Busulfan



$C_6H_{14}O_6S_2$ M_r 246,29 CAS 55-98-1

Je to tetramethylenbis(methansulfonat). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_6H_{14}O_6S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v acetonitrilu, velmi těžce rozpustný v lihu 96% a v etheru.

Taje při asi 116 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *busulfanu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.
Porovnávací roztok. 20 mg *busulfanu CRL* se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *acetonu R* a *toluenu R* po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší proudem teplého vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a zahřeje se na 120 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se hlavní skvrna polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K 0,1 g se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zahřívá se, až je roztok čirý. Po ochlazení se k 2 ml tohoto roztoku přidá 0,1 ml *manganistanu draselného RS*; fialově červené zbarvení se změní přes fialové na modré a nakonec na zelené. Směs se zfiltruje a přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS*; vznikne sraženina.

D. K 0,1 g se přidá 0,1 g *dusičnanu draselného R* a 0,25 g *hydroxidu sodného R*, promíchá se a zahřívá se do roztavení. Po ochlazení se zbytek rozpustí v 5 ml *vody R* a upraví se pH za použití *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* na hodnotu 1 až 2. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se bezprostředně před zkouškou rozpustí ve 20 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 0,20 g se zahřátím rozpustí v 50 ml *ethanolu R* a přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,250 g se přidá 50 ml *vody R,* protřepe se a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. V případě potřeby se doplní *vodou R* na původní objem, ochladí se a přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,32 mg $C_6H_{14}O_6S_2$.

Uchovávání

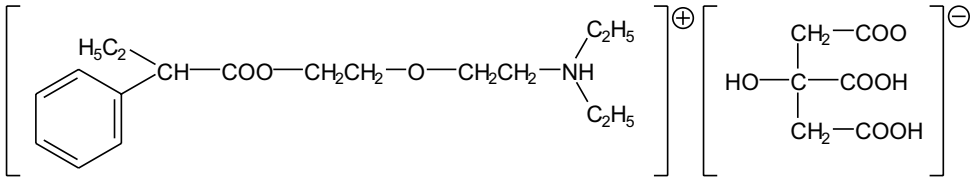
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

Butamirati dihydrogenocitras

N

Butamiraciumdihydrogencitrat



$C_{24}H_{37}NO_{10}$ M_r 499,56 CAS 18109-81-4

Je to N-[2-(2-fenylbutyryloxyethoxy)ethyl]-N,N-diethylamoniumdihydrogencitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{24}H_{37}NO_{10}$.

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek, mírně voskovitý. Je mírně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zasady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 74 °C až 78 °C.

B. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 220 nm až 300 nm; roztok vykazuje čtyři absorpční maxima; při 247 nm, 252 nm, 258 nm a 264 nm.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *butamiraciumdihydrogencitratu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Vyhovuje zkoušce na citronany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 4,0; měří se roztok S.

Cizí organické látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,50 g *butamiraciumdihydrogencitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a potom se 20 min zahřívá v sušárně při 100 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm; chromatogramy se použijí ke zkoušce totožnosti D. Potom se vrstva vystaví na 24 h působení par jodu a ihned po vyjmutí z komory s jodem se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %) a nejvýše jedna taková skvrna není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,4 %).

Chloridy (*2.4.4*). 1,50 g se rozpustí v 15 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Cizí snadno zuhelnitelné organické látky. 0,050 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové R;* roztok není zabarven intenzivněji než porovnávací barvený roztok HZ_5 (*2.2.2, Metoda II*).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se 4 h suší ve vakuu při 50 °C. Vysušená látka se použije ke Stanovení obsahu.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g ze zkoušky Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 5 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 49,96 mg $C_{24}H_{37}NO_{10}$.

Uchovávání

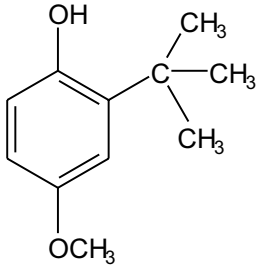
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

A. diethylaminoethoxyethanol.

Butylhydroxyanisolum

Butylhydroxyanisol



$C_{11}H_{16}O_2$ M_r 180,25 CAS 25013-16-5

Je to 2terc.butyl-4-methoxyphenol. Může obsahovat nejvýše 10,0 % 3-terc.butyl-4-methoxyphenolu.

Vlastnosti

Bílý až nažloutlý nebo slabě narůžovělý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, snadno rozpustný v lihu 96% a v mastných olejích. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

B. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 10 ml *aminopyrazolonu RS* a 1 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*, promíchá se a přidá se 10 ml *dichlormethanu R*. Směs se důkladně protřepe; po oddělení je organická vrstva zbarvena červeně.

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml roztoku *testosteronpropionatu R* (1,0 g/l) v *lihu 96% R* a 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 80 °C a potom se ochladí; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok intenzity 5 nejpodobnějšího zbarvení *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *butylhydroxyanisolu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 50 mg *hydrochinonu R* se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a zředí se *dichlormethanem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se *dichlormethanem R* po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší volně na vzduchu a postříká se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *hexakyanoželezitanu draselného RS, chloridu železitého RS1* a *vody R* (10 + 20 + 70). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná fialově modrá skvrna s hodnotou R_F asi 0,35 odpovídající 3-terc.butyl-4-methoxyfenolu intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (10 %); žádná skvrna odpovídající hydrochinonu není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících 3-terc.butyl-4-methoxyfenolu a hydrochinonu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

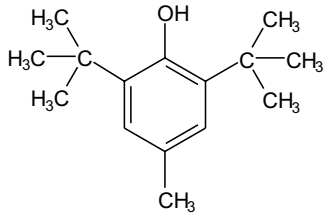
Chráněn před světlem.

Nečistoty

A. hydrochinon.

† Butylhydroxytoluenum

Butylhydroxytoluen



$C_{15}H_{24}O$ M_r 220,35 CAS 128-37-0

Je to 2,6-di-terc.butyl-4-methylfenol.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutobílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v acetonu a v etheru, snadno rozpustný v lihu 96% a v rostlinných olejích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Teplota tuhnutí, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 0,500 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 278 nm. Specifická absorbance v maximu je 80 až 90.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *butylhydroxytoluenu CRL.*

D. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml roztoku *testosteronpropionatu R* (1,0 g/l) v *lihu 96% R* a 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 80 °C a potom se ochladí; vzniká modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ nebo $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 69 °C až 70 °C.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se *dichlormethanem R* po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší volně na vzduchu a postříká se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *hexakyanoželezitanu draselného RS*, *chloridu železitého RS1* a *vody R* (10 + 20 + 70). Na

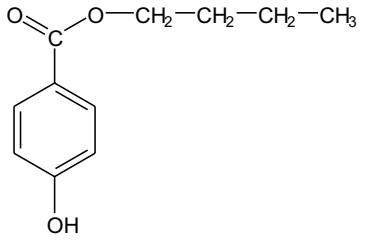
chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Butylparabenum

Butylparaben

Synonymum. Butylis parahydroxybenzoas



$C_{11}H_{14}O_3$ M_r 194,23 CAS 94-26-8

Je to butyl-4-hydroxybenzoat. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{11}H_{14}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, v etheru a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 68 °C až 71 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *butylparabenu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. K asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS*, zahřeje se k varu na 30 s a ochladí (roztok a). K dalším asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS*; látka se částečně rozpustí (roztok b). K roztokům (a) a (b) se současně přidá 5 ml *aminopyrazolonu RS* a 1 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS* a promíchá se; roztok (b) je žlutý nebo oranžově hnědý; roztok (a) je oranžový nebo červený a jeho zbarvení je zřetelně intenzivnější než podobné zbarvení získané s roztokem (b).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidají 3 ml *lihu 96% R*, 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Stanoví se tenkovrstvou chromatografií *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *butylparabenu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *propylparabenu R* se rozpustí v 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *methanolu R* (1 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nepřevyšuje žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se odváží do baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 40,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zpětný chladič propláchne 5 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá do baňky. Nadbytek hydroxidu sodného se titruje *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 194,2 mg $C_{11}H_{14}O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

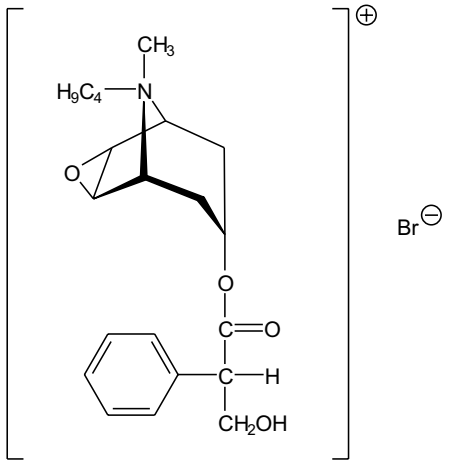
Nečistoty

A. kyselina 4-hydroxybenzoová,
B. methyl-4-hydroxybenzoat (methylparaben),
C. ethyl-4-hydroxybenzoat (ethylparaben),
D. propyl-4-hydroxybenzoat (propylparaben).

†† Butylscopolamini bromidum

Butylskopolaminiumbromid

Synonyma. Scopolamini butylbromidum, Scopolaminium butylbromatum, Hyoscini butylbromidum



$C_{21}H_{30}BrNO_4$ M_r 440,38 CAS 149-64-4

Je to N-butyl-6ß,7ß-epoxy-3α(1α*H*,5α*H*)-tropoyloxy-(*S*)-tropaniumbromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{30}BrNO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, mírně rozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 139 °C až 141 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *butylskopolaminiumbromidu CRL*.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *acetonu R* a přidá se 0,1 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R*; vznikne fialové zbarvení.

E. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného R*; žádná sraženina nevznikne.

F. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 6,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -18° až -20°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Skopolamin a jiné příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *skopolaminiumbromidu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). K 10 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 20 μl zkoušeného roztoku.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze připravené z 2,0 g *laurylsíranu sodného R* a směsi 370 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a 680 ml *methanolu R* s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, je-li na získaném chromatogramu rozlišení mezi píky skopolaminu a butylskopolaminu nejméně 5.

Odděleně se nastříkne 20 μl každého roztoku. Zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího skopolaminu větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %) a plocha žádného píku, kromě hlavního a píku odpovídajícího skopolaminu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %). K píku bromidových iontů v blízkosti píku rozpouštědla se nepřihlíží.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence za použití stříbrné elektrody jako indikační a argentchloridové elektrody jako srovnávací.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,04 mg $C_{21}H_{30}BrNO_4$.

Uchovávání

Venenum.

Cacao oleum

N

Kakaový olej

Je to filtrovaný nebo odstředěný tuk získaný za tepla lisováním pražených oloupaných a klíčků zbavených semen druhu *Theobroma cacao* L.

Vlastnosti

Nažloutlá mastná, poněkud křehká hmota, nevýrazné vůně po kakau a nevýrazné charakteristické chuti.

V ultrafialovém světle při 365 nm je inaktivní nebo vykazuje jen velmi nevýraznou fluorescenci.

Je velmi snadno rozpustný v etheru a v etheru petrolejovém, těžce rozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se zkouška Totožnost olejů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.2)*. Chromatogram zkoušeného roztoku se shoduje s charakteristickým chromatogramem pro kakaový olej.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.*
Zkoušený roztok (b). 0,05 g se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.*

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se zahřívá 10 min při 110 °C, po vychladnutí se postříká roztokem *rhodamidu R* (0,5 g/l) v *methanolu R.* Po několika minutách se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (400 g/l). Na chromatogramu se objevují na načervenalém podkladu zřetelné skvrny. Vrstva se vysuší v proudu horkého vzduchu a znovu se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (400 g/l). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) jsou patrné tři skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) nejsou v poloze vymezené skvrnami G až L patrné žádné skvrny.

B. Zkouška Absorbance, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 3 g se rozpustí v 9 ml *etheru R*; roztok je čirý *(2.2.1)*.

Index lomu. 1,456 až 1,459; stanoví se při 40 °C.

Teplota tání *(2.2.15) - metoda otevřené kapiláry*. 31 °C až 35 °C. Asi 50 g se roztaví zahřátím ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C a pak se za stálého míchání pomalu ochlazuje ve vodní lázni na 32 °C až 33 °C. Pak se nechá stát 24 h při teplotě 20 °C až 22 °C.

Z této hmoty se stanoví teplota tání v otevřené kapiláře; od 20 °C do 30 °C se teplota zvyšuje o nejvýše 1 °C/min a nad 30 °C o nejvýše 0,2 °C/min.

Absorbance. Nejvýše 0,18; 2 g se rozpustí mírným zahřátím v 5 ml *cyklohexanu R.* Roztok se převede do 100ml dělicí nálevky, baňka se promyje 5 ml *cyklohexanu R*, promývací tekutina se spojí s roztokem v dělicí nálevce. Pak se přidají 3 ml *hydroxidu sodného 4 mol/l RS* a směs se mírně protřepává 3 min až 4 min. Spodní vrstva se odstraní a vrchní vrstva se promyje sedmkrát 3 ml *vody R.* Spodní vrstva se vždy odstraní. K vrchní vrstvě se přidá 5 ml *cyklohexanu R*, zfiltruje se přes *síran sodný bezvodý R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. 0,100 g odparku se rozpustí v 10,0 ml *cyklohexanu R.* Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 270 nm.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 3; 10,0 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni pod zpětným chladičem v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 33 až 38.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 192 až 198.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 3.

Nezmýdelnitelné látky *(2.5.7)*. Nejvýše 0,3; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Bělené nebo zkažené oleje. 1,0 g se ve zkumavce protřepává 1 min s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, pak se smíchá s 1 ml *resorcinolu RS* a protřepává se 5 s. Po 5 min stání není vodná vrstva zbarvena intenzivněji *(2.2.2)* než 1 ml směsi složené z 0,05 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS* a 9,95 ml *vody R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Calcii carbonas

Uhličitan vápenatý

Synonyma. Calcium carbonicum praecipitatum, srážený uhličitan vápenatý

$CaCO_3$ M_r 100,09 CAS 471-34-1

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $CaCO_3$.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

B. 0,2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí v 80 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Když roztok přestane šumět, povaří se 2 min, ochladí se, zředí se *kyselinou octovou zředěnou RS* na 100 ml a podle potřeby se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla.

Látky nerozpustné v kyselině octové. Zbytek, který zůstal na filtru při přípravě roztoku S, se promyje čtyřikrát 5 ml horké *vody R* a suší se 1 h při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 10 mg (0,2 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 3 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,2 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,25 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *síranu vápenatého RS*. Po nejméně 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 10 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 50 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (200 μg/g).

Hořčík a alkalické kovy. 1,0 g se rozpustí v 12 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, asi 2 min se vaří, přidá se 20 ml *vody R*, 1 g *chloridu amonného R* a 0,1 ml *červeně methylové RS*. Potom se přidává *amoniak zředěný RS1*, dokud se nezmění barva indikátoru. Přidají se ještě 2 ml *amoniaku zředěného RS1*, zahřeje se k varu a přidá se 50 ml horkého *šťavelanu amonného RS* a nechá se 4 h stát. Potom se zředí *vodou R* na 100 ml a zfiltruje se přes vhodný filtr. K 50 ml filtrátu se přidá 0,25 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a žíhá se při 600 °C do konstantní hmotnosti. Zbytek váží nejvýše 7,5 mg (1,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2 %; 1,000 g se suší v sušárně při 200 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 20 ml *vody R* a 2 min se vaří. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 50 ml a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,01 mg $CaCO_3$.

Calcii chloridum dihydricum

Dihydrát chloridu vápenatého

Synonymum. Calcii chloridum

$CaCl_2 . 2H_2O$ M_r 147,02 CAS 10035-04-8

Obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $CaCl_2 . 2H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkouškám na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml čerstvě připraveného roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Jestliže je roztok červený, odbarví se přidáním nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*. Jestliže je roztok bezbarvý, ke vzniku červeného zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Hliník (*2.4.17*). K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *chloridu amonného RS*, 1 ml *amoniaku zředěného RS1* a zahřeje se k varu. Nevznikne žádný zákal nebo sraženina.

Pokud je látka určena pro výrobu dialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce, která nahrazuje zkoušku na hliník uvedenou výše.

4,0 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (1 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. K přípravě kontrolního roztoku se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *síranu vápenatého RS*. Po nejméně 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 1 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Hořčík a alkalické kovy. Ke směsi 20 ml roztoku S a 80 ml *vody R* se přidají 2 g *chloridu amonného R*, 2 ml *amoniaku zředěného RS1*, zahřeje se k varu a do vroucího roztoku se přileje horký roztok obsahující 5 g *šťavelanu amonného R* v 75 ml *vody R*. Nechá se 4 h stát, zředí se *vodou R* na 200 ml a zfiltruje se vhodným filtrem. Ke 100 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti při 600 °C. Zbytek váží nejvýše 5 mg (0,5 %).

Stanovení obsahu

0,280 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,70 mg $CaCl_2 . 2H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro výrobu dialyzačních roztoků.

Calcii chloridum hexahydricum

Hexahydrát chloridu vápenatého

Synonyma. Calcium chloratum, chlorid vápenatý

$CaCl_2 . 6H_2O$ M_r 219,08 CAS 7774-34-7

Obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $CaCl_2 . 6H_2O$.

Vlastnosti

Bílá krystalická hmota nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v lihu 96%.

Tuhne při asi 29 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkouškám na vápník *(2.3.1)*.

C. Rozmezí Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 15,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml čerstvě připraveného roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Jestliže je roztok červený, změní se jeho zbarvení přidáním nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*. Jestliže je roztok bezbarvý, ke vzniku červeného zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Hliník (*2.4.17*). K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *chloridu amonného RS*, 1 ml *amoniaku zředěného RS1* a zahřeje se k varu. Nevznikne žádný zákal nebo sraženina.

Pokud je látka určena pro výrobu dialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce, která nahrazuje zkoušku na hliník uvedenou výše.

6,0 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (1 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. K přípravě kontrolního roztoku se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *síranu vápenatého RS*. Po nejméně 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 1 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (15 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (7 μg/g).

Hořčík a alkalické kovy. Ke směsi 20 ml roztoku S a 80 ml *vody R* se přidají 2 g *chloridu amonného R*, 2 ml *amoniaku zředěného RS1*, zahřeje se k varu a do vroucího roztoku se přileje horký roztok obsahující 5 g *šťavelanu amonného R* v 75 ml *vody R*. Nechá se 4 h stát, zředí se *vodou R* na 200 ml a zfiltruje se vhodným filtrem. Ke 100 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti při 600 °C. Zbytek váží nejvýše 5 mg (0,3 %).

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*. 1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,91 mg $CaCl_2 . 6H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

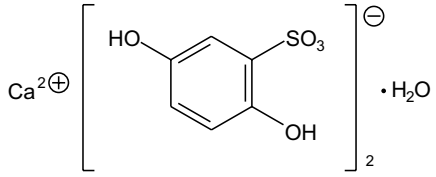
V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro výrobu dialyzačních roztoků.

Calcii dobesilas

1998

Dobesilan vápenatý

Synonyma. Calcium dobesilicum, Calcii dobesilas monohydricum



$C_{12}H_{10}CaO_{10}S_2 . H_2O$ M_r 436,42 CAS 20123-80-2

M_r bezvodého 418,40

Je to monohydrát vápenaté soli kyseliny 2,5-dihydroxybenzensulfonové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{12}H_{10}CaO_{10}S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu, velmi těžce rozpustný v 2-propanolu, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 200,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 210 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 221 nm a 301 nm. Specifická absorbance v maximu při 301 nm je 174 až 181.

B. 1 ml *chloridu železitého RS2*, 1 ml čerstvě připraveného roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (10 g/l) a 0,1 ml *kyseliny dusičné R* se smíchají. K této směsi se přidá 5 ml čerstvě připraveného roztoku S, viz Zkoušky na čistotu; ihned vznikne modré zbarvení a sraženina.

C. 2 ml čerstvě připraveného roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovují zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Čerstvě připravený roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,0; měří se roztok S.

Hydrochinon. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *hydrochinonu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku, nanesené body se vysuší proudem studeného vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *dichlormethanu R, methylacetatu R* a *ethylacetatu R* (20 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu horkého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající hydrochinonu není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (15 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo (*2.4.9*). 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,0 % až 6,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

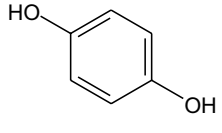
0,200 g se rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a titruje se *síranem ceričitým 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *síranu ceričitého 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,91 mg $C_{12}H_{10}CaO_{10}S_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

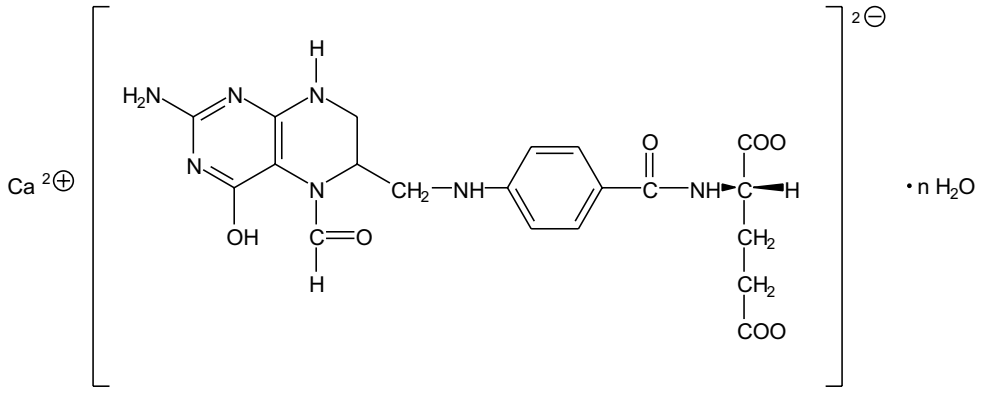
Nečistoty



A. hydrochinon (1,4-dihydroxybenzen).

Calcii folinas

Vápenatá sůl kyseliny folinové



$C_{20}H_{21}CaN_7O_7 \cdot nH_2O$ M_r bezvodé 511,51 CAS 1492-18-8

Je to vápenatá sůl kyseliny (2*S*)-2-{[4-[(6*RS*)-2-amino-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydro-4-hydroxy-6--pteridinyl]methylamino]benzamido}glutarové. Obsahuje 7,54 % až 8,14 % Ca a 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$, obojí počítáno na bezvodou a rozpouštědel prostou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý amorfní nebo krystalický prášek. Je mírně rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v acetonu a v lihu 96%. Amorfní forma může tvořit ve vodě přesycené roztoky.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *vápenaté soli kyseliny folinové CRL*. Pokud spektra vykazují rozdíly, zkoušená látka a referenční látka se odděleně rozpustí v co nejmenších objemech *vody R* a po kapkách se přidává takové množství *acetonu R*, aby vznikla sraženina. Směsi se nechají 15 min stát, sraženiny se oddělí odstředěním, promyjí se dvakrát malým množstvím *acetonu R*, vysuší se a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii F_{254} R*.

Zkoušený roztok. 15 mg se rozpustí v roztoku *amoniaku 17,5% RS* 3% *(V/V)* a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok. 15 mg *vápenaté soli kyseliny folinové CRL* se rozpustí v roztoku *amoniaku 17,5% RS* 3% *(V/V)* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *isoamylalkoholu R* a roztoku *kyseliny citronové R* (50 g/l), jehož pH bylo

předem upraveno *amoniakem 17,5% RS* na hodnotu 8, (1 + 10) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se provedou co nejrychleji a za ochrany před přímým světlem.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím na 40 °C, ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*. Absorbance *(2.2.25)* roztoku S měřená při 420 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny není vyšší než 0,60.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,8 až 8,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +14,4° až +18,0°; počítáno na látku bezvodou a prostou rozpouštědel; měří se roztok S.

Aceton, ethanol a methanol. Nejvýše 0,5 % acetonu, nejvýše 3,0 % ethanolu a nejvýše 0,5 % methanolu. Stanoví se plynovou chromatografií head-space metodou standardního přidání *(2.2.28, Metoda b)*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,125 g *acetonu R*, 0,750 g *ethanolu R* a 0,125 g *methanolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kolony délky 10 m a vnitřního průměru 0,32 mm potažené *styrendivinyl--benzen-kopolymerem R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 4 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se zvyšuje z 80 °C na 220 °C rychlostí 10 °C/min, teplota nástřikového prostoru se udržuje na 110 °C a teplota detektoru na 270 °C. Vzorky se vloží do komory s řízenou teplotou na dobu 20 min při 80 °C a tlakují se 30 s. Nástřiky se opakují nejméně třikrát.

Příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího kyselině formyllistové větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku kyseliny formyllistové, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

Chloridy *(2.4.4)*. 72 mg se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidají se 3 ml *kyseliny octové R*. Sraženina se odfiltruje a postupně se pětkrát promyje 5 ml *vody R*. Filtrát a promývací tekutiny se spojí a zředí se *vodou R* na 100 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 0,80 g ve vhodném žíhacím kelímku se přidá takové množství *kyseliny sírové R*, aby byla látka dostatečně zvlhčena, a opatrně se zahřívá při nízké teplotě až do úplného

zuhelnatění. Ke zbytku se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R* a opatrně se zahřívá, až přestanou unikat bílé dýmy. Pak se žíhá při 500 °C až 600 °C až do úplného spálení uhlíku. Po vychladnutí se přidají 4 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Kelímek se přikryje, zahřívá se 15 min na vodní lázni, pak se odkryje a obsah kelímku se pomalu odpaří na vodní lázni do sucha. Ke zbytku se přidá 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml horké *vody R*. Nechá se 2 min stát a pak se po kapkách přidává *amoniak zředěný RS1* do alkalické reakce na *papír lakmusový červený R*. Roztok se zředí *vodou R* na 25 ml a *kyselinou octovou zředěnou RS* se upraví pH roztoku na 3,0 až 4,0. Je-li třeba, zfiltruje se, kelímek i filtr se promyjí 10 ml *vody R* a filtrát spojený s promývací tekutinou se zředí *vodou R* na 40 ml.

K 12 ml roztoku získaného výše uvedeným způsobem se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5*, směs se promíchá a přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se opět promíchá. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený takto: 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)* se zředí *vodou R* na 25 ml, hodnota pH se upraví *kyselinou octovou zředěnou RS* na 3,0 až 4,0 a zředí se *vodou R* na 40 ml; k 12 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5*, promíchá se, přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se opět promíchá (50 μg/g).

Platina. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se rentgenovou fluorescenční spektrometrií *(2.2.37)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 17,0 %; stanoví se s 0,200 g velmi jemně upráškované látky, která se před vlastní titrací 6 min míchá v rozpouštědle. Použije se vhodné titrační činidlo, které neobsahuje pyridin.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Vápník. 0,400 g se rozpustí ve 150 ml *vody R*, zředí se jí na 300 ml a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,008 mg Ca.

Vápenatá sůl kyseliny folinové. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *vápenaté soli kyseliny folinové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *kyseliny formyllistové CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí porovnávacím roztokem (b) na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),

- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou je směs připravená takto: 220 ml *methanolu R* se smíchá se 780 ml roztoku obsahujícího 2,0 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu RS* a 2,2 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 7,5; v případě potřeby dosažení předepsaného rozlišení se upraví koncentrace methanolu,
- spektrofotometrického detektoru při 280 nm,
- injektorové smyčky.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C až 45 °C.

Odděleně se nastříkne po 10 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími vápenaté soli kyseliny folinové a kyselině formyllistové na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) je nejméně 2,2 a když relativní směrodatná odchylka ploch hlavního píku pro šest opakovaných nástřiků porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 2,0 %.

Obsah $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ v procentech se vypočte z ploch píků a deklarovaného obsahu *vápenaté soli kyseliny folinové CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

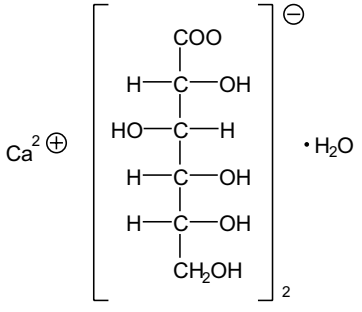
Nečistoty

A. kyselina 4-aminobenzoylglutamová,
B. kyselina 5,10-diformyltetrahydrolistová,
C. kyselina listová,
D. kyselina 10-formyllistová,
E. kyselina 5-formyltetrahydropteroová.

Calcii gluconas

Glukonan vápenatý

Synonymum. Calcium gluconicum



$C_{12}H_{22}CaO_{14} . H_2O$ M_r 448,39 CAS 18016-24-5

Je to monohydrát D-glukonanu vápenatého. Obsahuje 98,5 % až 102,0 % sloučeniny $C_{12}H_{22}CaO_{14} . H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický nebo zrněný prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v případě potřeby zahřátím ve vodní lázni při 60 °C v 1 ml *vody R*.

Porovnávací roztok. 20 mg *glukonanu vápenatého CRL* se rozpustí v případě potřeby zahřátím ve vodní lázni při 60 °C, v 1 ml *vody R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R, amoniaku 26% R*, *vody R* a *lihu 96% R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 20 min při 100 °C a po ochlazení se postříká roztokem *dichromanu draselného R* (50 g/l) v roztoku *kyseliny sírové R* (40%). Po 5 min se hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* zahřátím na 60 °C a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S zahřátý na 60 °C není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*. Po ochlazení na 20 °C roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Organické nečistoty a kyselina boritá. 0,5 g se převede do porcelánové misky předem opláchnuté *kyselinou sírovou R* a vloží se do ledové lázně. Přidají se 2 ml ochlazené *kyseliny sírové R* a promíchá se; nevznikne žluté nebo hnědé zbarvení. Přidá se 1 ml *chromotropinu 2 B RS;* vznikne fialové zbarvení, které nepřechází na tmavě modré. Roztok není zbarven intenzivněji než směs 1 ml *chromotropinu 2 B RS* a 2 ml ochlazené *kyseliny sírové R*.

Sacharosa a redukující cukry. 0,5 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 10 ml *vody R* a 5 min se vaří. Po ochlazení se přidá 10 ml *uhličitanu sodného RS* a nechá se stát. Potom se zředí *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. K 5 ml filtrátu se přidají 2 ml *vínanu měďnatého RS*, 1 min se vaří a 2 min se nechá stát; nevznikne červená sraženina.

Chloridy *(2.4.4)*. 12,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10,0 g se zahřátím rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové R* a 90 ml *vody destilované R*. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Zkoušená látka se opatrně zahřívá, dokud se nezmění na bílou hmotu, která se vyžíhá. Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Hořčík a alkalické kovy. 1,00 g se rozpustí ve 100 ml vroucí *vody R*, přidá se 10 ml *chloridu amonného RS*, 1 ml *amoniaku R* a po kapkách 50 ml horkého *šťavelanu amonného RS*. Nechá se 4 h stát, potom se zředí *vodou R* na 200 ml a zfiltruje se. 100 ml filtrátu se odpaří do sucha a vyžíhá se. Zbytek váží nejvýše 2 mg (0,4 %).

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou.

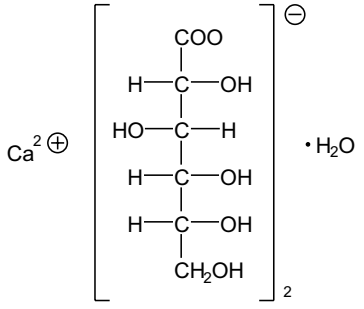
Stanovení obsahu

0,800 g se rozpustí ve 20 ml horké *vody R* a po ochlazení se zředí *vodou R* na 300 ml. Provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,84 mg $C_{12}H_{22}CaO_{14} . H_2O$.

Calcii gluconas pro iniectione

Glukonan vápenatý na injekci



$C_{12}H_{22}CaO_{14} . H_2O$ M_r 448,39 CAS 18016-24-5

Je to monohydrát D-glukonanu vápenatého. Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{22}CaO_{14} . H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický nebo zrněný prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v případě potřeby zahřátím ve vodní lázni při 60 °C v 1 ml *vody R*.

Porovnávací roztok. 20 mg *glukonanu vápenatého CRL* se rozpustí v případě potřeby zahřátím ve vodní lázni při 60 °C v 1 ml *vody R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R, amoniaku 26% R*, *vody R* a *lihu 96% R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 20 min při 100 °C a potom se postříká roztokem *dichromanu draselného R* (50 g/l) ve 40% roztoku *kyseliny sírové R*. Po 5 min se chromatogram pozoruje na denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je hlavní skvrna polohou, barvou a velikostí shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 10,0 g se přidá 90 ml vroucí *destilované vody R;* směs se vaří za stálého míchání nejvýše 10 s a míchá se do úplného rozpuštění. Zředí se *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S zahřátý na 60 °C není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*. Po ochlazení na 20 °C roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,4 až 8,3; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* zahřátím na vodní lázni.

Organické nečistoty a kyselina boritá. 0,5 g se převede do porcelánové misky předem opláchnuté *kyselinou sírovou R* a vloží se do ledové lázně. Přidají se 2 ml ochlazené *kyseliny sírové R* a promíchá se; nevznikne žluté nebo hnědé zbarvení. Přidá se 1 ml *chromotropinu 2 B RS*; vznikne fialové zbarvení, které nepřechází na tmavě modré. Zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení směsi 1 ml *chromotropinu 2 B RS* a 2 ml ochlazené *kyseliny sírové R*.

Šťavelany. Nejvýše 100 μg/g; provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě pro chromatografii R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě pro chromatografii R*, přidá se 0,5 ml roztoku *šťavelanu sodného R* (0,152 g/l) ve *vodě pro chromatografii R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- předkolony délky 30 mm a vnitřního průměru 4 mm naplněné vhodným silným anexem (30 μm až 50 μm),
- dvou analytických kolon délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněných vhodným silným anexem (30 μm až 50 μm),

- mikromembránové anionpotlačující kolony, která je zapojena v sérii na předkolonu a dvě analytické kolony; anionpotlačující kolona je vybavena mikromembránou, která odděluje mobilní fázi od regeneračního potlačujícího roztoku protékajícího proti toku mobilní fáze rychlostí 4 ml/min,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min připravené následovně: 0,212 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a 63 mg *hydrogenuhličitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě pro chromatografii R* a zředí se jí na 1000,0 ml,
- regeneračního anionpotlačujícího roztoku; roztok *kyseliny sírové R* (1,23 g/l) ve *vodě pro chromatografii R*,
- vodivostního detektoru,
- injektorové smyčky.

50 μl porovnávacího roztoku se vstříkne pětkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku šťavelanu na chromatogramu porovnávacího roztoku je nejvýše 2 %. 50 μl každého roztoku se vstříkne třikrát.

Obsah šťavelanu v μg/g se vypočte podle vzorce:

$$\frac{S_T \cdot 50}{S_R - S_T},$$

v němž značí:
S_T - plochu píku šťavelanu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S_R - plochu píku šťavelanu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Sacharosa a redukující cukry. 0,5 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 10 ml *vody R*. 5 min se vaří, po ochlazení se přidá 10 ml *uhličitanu sodného RS* a nechá se stát 10 min. Potom se zředí *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. K 5 ml filtrátu se přidají 2 ml *vínanu měďnatého RS*, 1 min se vaří a 2 min se nechá stát; nevznikne červená sraženina.

Chloridy *(2.4.4)*. K 10 ml zfiltrovaného roztoku S se přidá 5 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Fosforečnany *(2.4.11)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 100 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na fosforečnany (100 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml zfiltrovaného roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/g). Porovnávací roztok se připraví smícháním 7,5 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 7,5 ml *vody destilované R*.

Železo. Nejvýše 5 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 2,0 g se vloží do 100ml polytetrafluorethylenové kádinky, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné R* a vaří se, dokud roztok není odpařen téměř do sucha. Přidá se 1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a opět se odpaří téměř do sucha. Přidání a odpaření peroxidu vodíku se opakuje, dokud se nezíská čirý roztok. Za použití 2 ml *kyseliny dusičné R* se převede získaný čirý roztok do 25ml odměrné baňky a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* po značku. Stejným způsobem se připraví kontrolní roztok za použití 0,65 g *chloridu vápenatého R1* místo zkoušené látky.
Porovnávací roztoky. Připraví se zředěním základního *roztoku železa (20 μg Fe/ml) kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*.

Měří se absorbance při 248,3 nm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen. Provede se základní korekce za použití deuteriové lampy.

Hořčík a alkalické kovy. K 0,50 g se přidá směs obsahující 1,0 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 10,0 ml *vody R*. Rychle se zahřeje k varu a míchá se do úplného rozpuštění. K vroucímu roztoku se přidá 5,0 ml *šťavelanu amonného RS* a nechá se nejméně 6 h stát. Zfiltruje se přes filtr ze slinutého skla (1,6) do porcelánového kelímku, opatrně se odpaří do sucha a vyžíhá se. Zbytek váží nejvýše 2 mg (0,4 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 167 m.j. v gramu.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa a Staphylococcus aureus (2.6.13)*.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí ve 20 ml horké *vody R* a po ochlazení se zředí *vodou R* na 300 ml. Provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)* za použití 50 mg *kyseliny kalkonkarboxylové s chloridem sodným R*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,84 mg $C_{12}H_{22}CaO_{14} . H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii glycerophosphas

Glycerofosforečnan vápenatý

$C_3H_7CaO_6P$ M_r 210,14 CAS 27214-00-2

Je to směs různých dílů vápenatých solí kyseliny (*RS*)-2,3-dihydroxypropylfosforečné a kyseliny 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-ethylfosforečné, které mohou být hydratovány. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 18,6 % až 19,4 % Ca.

Vlastnosti

Bílý hygroskopický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se ve zkumavce se skleněnou trubičkou smíchá s 1 g *hydrogensíranu draselného R* a silně se zahřeje. Tvoří se bílé dýmy, které se zachytávají do kousku filtračního papíru impregnovaného čerstvě připraveným roztokem *nitroprussidu sodného R* (10 g/l); filtrační papír se zbarví do modra při styku s *piperidinem R*.

B. 0,1 g se žíhá v kelímku. Zbytek se převede do 5 ml *kyseliny dusičné R*, zahřívá se 1 min na vodní lázni a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

C. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,5 g se rozpustí při pokojové teplotě ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 150 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 100 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Kyselina citronová. 5,0 g se protřepe s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,15 ml *kyseliny sírové R* a opět se zfiltruje. K filtrátu se přidá 5 ml *síranu rtuťnatého RS*, zahřeje se k varu, přidá se 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (3,2 g/l) a opět se zahřeje k varu; nevznikne sraženina.

Glycerol a látky rozpustné v lihu 96%. 1,000 g se třepe 1 min s 25 ml *lihu 96% R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha na vodní lázni a zbytek se suší 1 h při 70 °C. Zbytek váží nejvýše 5 mg (0,5 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,1 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny octové R* a 8 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 μg/g).

Fosforečnany *(2.4.11)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 100 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na fosforečnany (400 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Arsen *(2.4.2)*. 0,33 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (3 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí v 10 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,20 g vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 12,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 150 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve *vodě R* a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,008 mg Ca.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii hydrogenophosphas

Hydrogenfosforečnan vápenatý

Synonymum. Calcii hydrogenophosphas anhydricus

$CaHPO_4$ M_r 136,06 CAS 7757-93-9

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $CaHPO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěné kyselině chlorovodíkové a zředěné kyselině dusičné.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Dihydrogenfosforečnan vápenatý a fosforečnan vápenatý, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. 0,1 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 5 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové R* a přidá se 0,5 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS*; roztok zůstane čirý. Přidá se asi 50 mg *chloridu amonného R* a nechá se 5 min stát; vzniká bílá krystalická sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, v případě potřeby se zfiltruje a přidává se *amoniak zředěný RS1*, dokud se nevytvoří sraženina. Přidá se minimální množství *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, aby se sraženina rozpustila, a směs se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Dihydrogenfosforečnan vápenatý a fosforečnan vápenatý. 2,00 g se rozpustí ve 30,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*, přidá se 20 ml *vody R* a 0,05 ml *modři bromfenolové RS*. Nadbytek kyseliny chlorovodíkové se titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*. Spotřeba *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* je 14,0 ml až 15,5 ml.

Uhličitany. 0,5 g se protřepe s 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*; roztok nešumí.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,5 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny dusičné R* a 10 *vody R* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Fluoridy *(2.4.5)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce na fluoridy (100 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 1 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 25 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,5 %).

Arsen *(2.4.2)*. 2 ml roztoku S vyhovují limitní zkoušce A na arsen (10 μg/g).

Baryum. K 10 ml filtrovaného roztoku S se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Po 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 0,5 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (40 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (400 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 150 °C.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 5 ml *vody R*, přidá se 25,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 200 ml. Směs se neutralizuje *amoniakem 26% R*, přidá se 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0* a asi 50 mg *černě eriochromové T s chloridem sodným R*. Nadbytek edetanu disodného se titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* až do změny modrého zbarvení na fialové. Provede se slepá zkouška.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,61 mg $CaHPO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii hydrogenophosphas dihydricus

Dihydrát hydrogenfosforečnanu vápenatého

Synonymum. Calcium hydrogenphosphoricum

$CaHPO_4 . 2H_2O$ M_r 172,09 CAS 7789-77-7

Obsahuje 98,0 % až 105,0 % sloučeniny $CaHPO_4 . 2H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěné kyselině chlorovodíkové a ve zředěné kyselině dusičné.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 5 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

C. Rozmezí Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, v případě potřeby se zfiltruje a přidává se *amoniak zředěný RS1*, dokud se nevytvoří sraženina. Potom se přidá takové

množství *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, aby se sraženina rozpustila, a směs se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Dihydrogenfosforečnan vápenatý a fosforečnan vápenatý. 2,00 g se rozpustí ve 30,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*, přidá se 20 ml *vody R* a 0,05 ml *oranže methylové RS*. Nadbytek kyseliny chlorovodíkové se titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*. Spotřeba *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* je 11,0 ml až 12,5 ml.

Uhličitany. 0,5 g se protřepe s 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*; roztok nešumí.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,5 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny dusičné R* a 10 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Fluoridy *(2.4.5)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce na fluoridy (100 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 1 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 25 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,5 %).

Arsen *(2.4.2)*. 2 ml roztoku S vyhovují limitní zkoušce A na arsen (10 μg/g).

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Po 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 0,5 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (40 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (400 μg/g).

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 5 ml *vody R*, přidá se 25,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 200 ml. Směs se neutralizuje *amoniakem 26% R*, přidá se 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0* a asi 50 mg *černě eriochromové T s chloridem sodným R*. Nadbytek edetanu disodného se titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* do změny modrého zbarvení na fialové. Provede se slepá zkouška.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,21 mg $CaHPO_4 . 2H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

---

† Calcii hydroxidum

Hydroxid vápenatý

$Ca(OH)_2$ M_r 74,10 CAS 1305-62-0

Obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $Ca(OH)_2$.

Vlastnosti

Bílý jemný prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,80 g ve třecí misce se přidá 10 ml *vody R*, 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a promíchá se; suspenze zčervená. Po přidání 17,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* se suspenze odbarví bez šumění. Suspenze se 1 min roztírá; červené zbarvení se znovu objeví. Přidá se 6 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a znovu se rozetře; směs se odbarví.

B. 20 mg se rozpustí v *kyselině octové R* a zředí se jí na 50 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*

Zkoušky na čistotu

Látky nerozpustné v kyselině chlorovodíkové. 2,0 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, povaří se a roztok se zfiltruje. Zbytek se promyje horkou *vodou R,* vysuší se a zváží se; hmotnost zbytku je nejvýše 10 mg (0,5 %).

Uhličitany. Nejvýše 5,0 % $CaCO_3$. Ke ztitrovanému roztoku ze zkoušky Stanovení obsahu se přidá 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 50,05 mg $CaCO_3$.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,30 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny dusičné R* a 10 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 30 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,15 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 10 ml *vody R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 60 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,4 %).

Arsen *(2.4.2)*. 0,50 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové s bromem RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml. 25 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na arsen (4 μg/g).

Hořčík a alkalické kovy. 1,0 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 40 ml *vody R*, povaří se a přidá se 50 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (63 g/l). Zneutralizuje se *amoniakem 17,5% RS*, zředí se *vodou R* na 200 ml, nechá se 1 h stát a zfiltruje se přes vhodný filtr. Ke 100 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, opatrně se odpaří do sucha a vyžíhá se. Zbytek váží nejvýše 20 mg (4,0 %, počítáno jako sírany).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 20 ml *vody R* a zfiltruje se. 12 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Stanovení obsahu

K 1,500 g v třecí misce se přidá 20 ml až 30 ml *vody R* a 0,5 ml *fenolftaleinu RS.* Titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* za roztírání látky do odstranění červeného zbarvení. Ztitrovaný roztok se použije ve zkoušce Uhličitany, viz Zkoušky na čistotu.

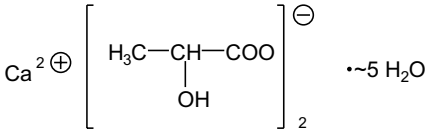
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 37,05 mg $Ca(OH)_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Calcii lactas pentahydricus

Pentahydrát mléčnanu vápenatého



$C_6H_{10}CaO_6 \cdot \sim 5H_2O$ M_r bezvodého 218,22 CAS 63690-56-2

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % vápenaté soli kyseliny (*RS*)-2--hydroxypropionové nebo směsi vápenatých solí kyseliny (*R*)-, (*S*)- a (*RS*)-2-hydroxypropionové. Látka obsahuje 22,0 % až 27,0 % vody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický nebo zrněný prášek snadno větrající. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Vyhovuje zkoušce na mléčnany *(2.3.1)*.

C. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a po ochlazení se jí zředí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je bezbarvý. Ke vzniku růžového zbarvení indikátoru se spotřebují nejvýše 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Těkavé mastné kyseliny. 0,5 g se míchá s 1 ml *kyseliny fosforečné R* ve 100ml baňce se zabroušenou zátkou. Baňka se uzavře a opatrně se 10 min zahřívá při 50 °C. Ihned po otevření baňky není cítit nepříjemný pach nižších mastných kyselin.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (400 μg/g).

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *síranu vápenatého RS*. Po 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 1 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy *(20 μg/g)*. Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Hořčík a alkalické soli. K 20 ml roztoku S se přidá 20 ml *vody R*, 2 g *chloridu amonného R* a 2 ml *amoniaku zředěného RS1*. Zahřeje se k varu, rychle se přidá 40 ml horkého *šťavelanu amonného RS* a nechá se 4 h stát. Potom se směs zředí *vodou R* na 100,0 ml a zfiltruje se. K 50,0 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se do sucha a zbytek se žíhá do konstantní hmotnosti při 600 °C. Zbytek po žíhání váží nejvýše 5 mg (1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 22,0 % až 27,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 125 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 300 ml a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.

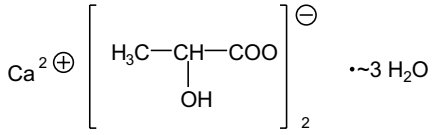
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,82 mg $C_6H_{10}CaO_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii lactas trihydricus

Trihydrát mléčnanu vápenatého



$C_6H_{10}CaO_6 \cdot \sim 3H_2O$ M_r bezvodého 218,22 CAS 63690-56-2

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % vápenaté soli kyseliny (*RS*)-2-hydroxypropionové nebo směsi vápenatých solí kyseliny (*R*)-, (*S*)- a (*RS*)-2-hydroxypropionové. Látka obsahuje 15,0 % až 20,0 % vody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický nebo zrněný prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Vyhovuje zkoušce na mléčnany *(2.3.1)*.

C. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a po ochlazení se jí zředí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je bezbarvý. Ke vzniku růžového zbarvení indikátoru se spotřebují nejvýše 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Těkavé mastné kyseliny. 0,5 g se míchá s 1 ml *kyseliny fosforečné R* ve 100ml baňce se zabroušenou zátkou. Baňka se uzavře a opatrně se 10 min zahřívá při 50 °C. Ihned po otevření baňky není cítit nepříjemný pach nižších mastných kyselin.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (400 μg/g).

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *síranu vápenatého RS*. Po 15 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 1 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy *(20 μg/g)*. Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Hořčík a alkalické soli. K 20 ml roztoku S se přidá 20 ml *vody R*, 2 g *chloridu amonného R* a 2 ml *amoniaku zředěného RS1*. Zahřeje se k varu, rychle se přidá 40 ml horkého *šťavelanu amonného RS* a nechá se 4 h stát. Potom se směs zředí *vodou R* na 100,0 ml a zfiltruje se. K 50,0 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se do sucha a zbytek se žíhá do konstantní hmotnosti při 600 °C. Zbytek po žíhání váží nejvýše 5 mg (1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 15,0 % až 20,0 %; suší se 0,500 g v sušárně při 125 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 300 ml a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,82 mg $C_6H_{10}CaO_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii oxidum

N

Oxid vápenatý

Synonymum. Calcium oxydatum

CaO M_r 56,08 CAS 1305-78-8

Je to vyžíhaný bílý vápenec. Počítáno na vyžíhanou látku, obsahuje 97,0 % až 100,5 % sloučeniny CaO.

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá lehká amorfní hmota nebo bílý prášek, bez zápachu. Je prakticky nerozpustný v lihu 96 %.

Na vzduchu přijímá vlhkost a oxid uhličitý. Navlhčí-li se polovičním množstvím vody, silně se zahřívá a tvoří se těžce rozpustný hydroxid vápenatý, který po přidání dalšího množství vody vytvoří bílou, zakalenou tekutinu silně zásadité reakce (vápenné mléko). Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník (*2.3.1*).

B. 1 g látky se zvlhčí 0,5 ml vlažné *vody R*. Dojde k prudké reakci za uvolnění tepla a vzniku bílé práškovité sloučeniny (hašené vápno).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,000 g vyžíhané sloučeniny se zvlhčí 0,5 ml *vody R*, po chvíli se přidá 1,0 ml *vody R* a směs se kvantitativně převede 25 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* do 50ml kuželové baňky. Směs se zfiltruje filtrem ze slinutého skla (4) a promyje se čtyřikrát 5 ml *vody R*. Filtrát a promývací tekutina se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Chloridy (*2.4.4*). 10 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (250 µg/g).

Sírany (*2.4.13*). 3 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovují limitní zkoušce na sírany (0,25 %).

Ztráta žíháním. Nejvýše 9,0 %; 1,200 g se žíhá při 600 °C v platinovém kelímku do konstantní hmotnosti.

Stanovení obsahu

Použijí se 2,0 ml roztoku S, přidá se asi 30 mg *kyseliny kalkonkarboxylové s chloridem sodným R* a provede se chelatometrická titrace vápníku do změny vínově červeného zbarvení na čistě modré (*2.5.11*).

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,608 mg CaO.

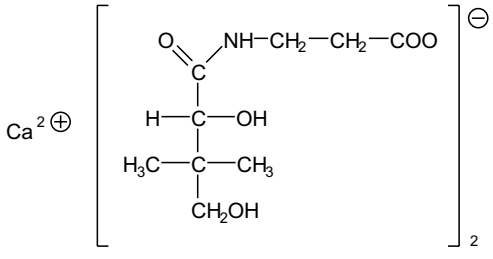
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před vlhkostí a oxidem uhličitým.

Calcii pantothenas

Pantothenan vápenatý

Synonymum. Calcium pantothenicum



$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$ M_r 476,54 CAS 137-08-6

Je to vápenatá sůl kyseliny (*R*)-3-(2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutyramido)propionové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$.

Vlastnosti

Bílý slabě hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je současně zkouškou totožnosti.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce β-alanin, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,1 ml *síranu měďnatého RS;* vznikne modré zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,8 až 8,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +25,5° až +27,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

-alanin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *pantothenanu vápenatého CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *-alaninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *ethanolu R* (35 + 65) po dráze 12 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min při 110 °C. Žádná skvrna odpovídající skvrně β-alaninu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5%).

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,180 g se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,83 mg $C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Calcii phosphas

1998

Fosforečnan vápenatý

Synonymum. Tricalcii phosphas

CAS 7758-87-4

Je to směs obsahující fosforečnany vápenaté.
Obsahuje 35,0 % až 40,0 % Ca (A_r 40,08).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě. Rozpouští se ve zředěné kyselině chlorovodíkové a ve zředěné kyselině dusičné.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí v 5 ml roztoku *kyseliny dusičné R* 25% *(V/V)*. Roztok vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

B. 0,2 g se žíhá v kelímku. Nechá se vychladnout a přidá se 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1;* směs je žlutá.

C. Vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*. Před přidáním roztoku *hexakyanoželeznatanu draselného RS* se zfiltruje.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Není-li roztok čirý, zfiltruje se. Pak se přidá po kapkách *amoniak zředěný RS1*, dokud nevznikne sraženina. Sraženina se rozpustí přidáním *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,22 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny dusičné R* a 10 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 100 ml. 15 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,15 %).

Fluoridy. Nejvýše 50 μg/g; stanoví se potenciometricky za použití fluorido-selektivní indikační elektrody a argentchloridové srovnávací elektrody *(2.2.36, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. V 50ml odměrné baňce se rozpustí 0,250 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, přidá se 5,0 ml základního *roztoku fluoridů (1 μg F/ml)* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 50,0 ml. K 20,0 ml roztoku se přidá 20,0 ml *tlumivého roztoku k úpravě celkové iontové síly* a 3 ml roztoku *octanu sodného bezvodého R* (82 g/l), upraví se hodnota pH na 5,2 *amoniakem R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztoky. K 5,0 ml, 2,0 ml, 1,0 ml, 0,5 ml a 0,25 ml základního *roztoku fluoridů (10 μg F/ml)* se přidá po 20,0 ml *tlumivého roztoku k úpravě celkové iontové síly* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50,0 ml.

Měří se 20,0 ml každého roztoku. Koncentrace fluoridů se vypočítá z kalibrační křivky; v úvahu je nutno brát přidání fluoridu k roztoku zkoušené látky.

Sírany *(2.4.13)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 25 ml. 15 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,5 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 13 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (30 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (400 μg/g).

Látky nerozpustné v kyselině. 5,0 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 30 ml *vody R*. Zfiltruje se, zbytek se promyje *vodou R* a suší se do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 10 mg (0,2 %).

Ztráta žíháním. Nejvýše 8,0 %; 1,000 g se žíhá 30 min při 800 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 5 ml *vody R*. Přidá se 25,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 200 ml; pH se upraví *amoniakem 26% R* na

hodnotu asi 10. Přidá se 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0* a několik miligramů *černi eriochromové T s chloridem sodným R*. Nadbytek edetanu disodného se titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* do změny modrého zbarvení na fialové.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,008 mg Ca.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii stearas

Stearan vápenatý

CAS 1592-23-0

Je to směs vápenatých solí různých mastných kyselin obsahující hlavně stearan vápenatý [$(C_{17}H_{35}COO)_2Ca$; M_r 607,03] a palmitan vápenatý [$(C_{31}H_{62}CO_2O)_2Ca$; M_r 550,92] s menším množstvím jiných mastných kyselin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 6,4 % až 7,4 % Ca (A_r 40,08). Podíl mastných kyselin obsahuje nejméně 40 % kyseliny stearové a součet kyselin stearové a palmitové je nejméně 90,0 %.

Vlastnosti

Jemný bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tuhnutí *(2.2.18)* zbytku získaného při přípravě roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, není nižší než 54 °C.

B. Číslo kyselosti *(2.5.1)* mastných kyselin je 195 až 210; stanoví se s 0,20 g zbytku získaného při přípravě roztoku S rozpuštěného v 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Mastné kyseliny, viz Stanovení obsahu. Retenční časy hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku se shodují s retenčními časy píků kyseliny stearové a kyseliny palmitové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 5 ml roztoku S se neutralizuje *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* za použití *papíru lakmusového červeného R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (b) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 5,0 g se přidá 50 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 20 ml *vody destilované R*. Směs se zahřívá pod zpětným chladičem až do úplného rozpuštění a nechá se ochladit. Převede se do dělicí nálevky, oddělí se vodná vrstva a etherová vrstva se protřepe dvakrát 5 ml *vody destilované R*. Spojené vodné vrstvy se promyjí 15 ml *etheru*

prostého peroxidických látek R a vodná vrstva se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml (roztok S). Etherová vrstva se odpaří, zbytek se suší při 100 °C až 105 °C a použije se ke zkoušce totožnosti A a B.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 1,0 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, vaří se 1 min za stálého míchání, ochladí se a zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *modři bromthymolové RS1*. Na změnu zbarvení indikátoru se použije nejvýše 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,3 %).

Kadmium. Nejvýše 3 μg Cd/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se umístí do polytetrafluoroethylenové lahve a přidá se 0,5 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny dusičné prosté olova a kadmia R* (1 + 5). Digeruje se 5 h při 170 °C a ochladí se. Zbytek se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku kadmia (10 μg Cd/ml)* a zředí se podle potřeby roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*).

Měří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou jako zdroje záření.

Olovo. Nejvýše 10 μg Pb/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 40,0 mg se umístí do polytetrafluoroethylenové lahve a přidá se 0,5 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny dusičné prosté olova a kadmia R* (1 + 5). Digeruje se 5 h při 170 °C a ochladí se. Zbytek se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)* a zředí se podle potřeby *vodou R*.

Měří se absorbance při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření.

Nikl. Nejvýše 5 μg Ni/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 40,0 mg se umístí do polytetrafluoroethylenové lahve a přidá se 0,5 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny dusičné prosté olova a kadmia R* (1 + 5). Digeruje se 5 h při 170 °C a ochladí se. Zbytek se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku niklu (10 μg Ni/ml)* a zředí se podle potřeby *vodou R*.

Měří se absorbance při 232,0 nm za použití niklové lampy s dutou katodou jako zdroje záření.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 6,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Stanovení obsahu

Vápník. K 0,500 g v 250ml kuželové baňce se přidá 50 ml směsi stejných objemových dílů *1-butanolu R* a *ethanolu R*, 5 ml *amoniaku 26% R*, 3 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0*, 30,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* a 15 mg *černi eriochromové T s chloridem sodným RS*. Zahřívá se při 45 °C až 50 °C, dokud není roztok čirý. Po ochlazení se titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* do změny modrého zbarvení na fialové. Provede se slepá zkouška.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,008 mg Ca.

Mastné kyseliny. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se v kuželové baňce s nasazeným zpětným chladičem rozpustí v 5 ml roztoku *fluoridu boritého R* (140 g/l) v *methanolu R* a vaří se 10 min pod zpětným chladičem. Přidají se 4 ml *heptanu R*, znovu se vaří 10 min pod zpětným chladičem a ochladí se. Přidá se 20 ml nasyceného roztoku *chloridu sodného R*, protřepe se a nechají se oddělit vrstvy. Odebere se asi 1 ml organické vrstvy a vysuší se nad 0,1 g *síranu sodného bezvodého R*.

Porovnávací roztok. Připraví se stejným způsobem jako zkoušený roztok za použití 66,0 mg *kyseliny stearové CRL* a 33,0 mg *kyseliny palmitové CRL* místo zkoušené látky.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- skleněné kolony 2 m dlouhé a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 10 % *poly(kyanopropylmethylfenyl)siloxanu R* (125 μm až 136 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony při nástřiku se udržuje při 80 °C, potom se teplota zvyšuje rychlostí 6 °C/min do 200 °C a při této teplotě se udržuje po dobu 20 min. Teplota vstřikovacího prostoru se udržuje na 300 °C a teplota detektoru na 290 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku rozlišení mezi píky kyseliny stearové a kyseliny palmitové je nejméně 5. Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku a vypočítá se procentuální obsah kyseliny stearové a kyseliny palmitové běžnými postupy.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii sulfas dihydricus

Dihydrát síranu vápenatého

$CaSO_4 . 2H_2O$ M_r 172,17 CAS 10101-41-4

Obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $CaSO_4 . 2H_2O$.

Vlastnosti

Bílý jemný prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Ztráta žíháním, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v 50 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 10% *(V/V)* zahříváním při 50 °C po dobu 5 min. Roztok se nechá vychladnout.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,5 g se 5 min třepe s 15 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Nechá se 5 min stát a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*; roztok je červený. Přidá se 0,30 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok se odbarví. Přidá se 0,2 ml *červeně methylové R*; roztok je červenooranžový.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,5 g se třepe 5 min s 15 ml *vody R*. Nechá se 15 min stát a zfiltruje se. 5 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (300 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 2,5 g se přidá směs 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 15 ml *vody R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS*. Opatrně se přidává *amoniak 26% R*, dokud se zbarvení nezmění na růžové. Přidá se 0,5 ml *kyseliny octové ledové R*, zředí se *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. 12 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. K 0,25 g se přidá směs 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, zahřeje se k varu, ochladí se a zfiltruje. 10 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na železo (100 μg/g).

Ztráta žíháním. 18,0 % až 22,0 %; 1,000 g se žíhá do konstantní hmotnosti při 800 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 120 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*. 1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,22 mg $CaSO_4 . 2H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Calcii sulfas hemihydricus

N

Hemihydrát síranu vápenatého

Synonyma. Calcii sulfuricum ustum, pálený síran vápenatý

$CaSO_4 . 1/2H_2O$ M_r 145,15 CAS 10034-76-1

Je to α- nebo β-hydratovaný síran vápenatý nebo směs obou forem a může obsahovat vhodné urychlovače nebo zpomalovače tuhnutí. Obsahuje nejméně 90,0 % sloučeniny $CaSO_4 . 0,5H_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný prášek, slabě hygroskopický. Je těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Stanovení velikosti částic, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 4,0 g se třepou s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a směs se ihned zfiltruje.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5,0 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS.* Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Stanovení velikosti částic *(2.9.13)*. Nejméně 98 % projde sítem (250); stanoví se s 25 g zkoušené látky.

Cizí částice. Zbytek získaný ve zkoušce Stanovení velikosti částic neobsahuje šedá zrna.

Zkouška tuhnutí. Při roztírání 20 g s 10 ml *vody R* vzniká po 4 min až 11 min tuhá, netvárná hmota. Po 3 h stání se tato hmota vyznačuje dostatečnou odolností vůči tlaku prstů na hrany, které mají zůstat v liniích ostré a nemají se drobit.

Ztráta žíháním. 4,5 % až 8,0 %; 1,000 g se žíhá do konstantní hmotnosti při 800 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 120 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace vápníku *(2.5.11)*. 1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,51 mg $CaSO_4 . 1/2H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Calcitoninum salmonis

Lososí kalcitonin

Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH_2

$C_{145}H_{240}N_{44}O_{48}S_2$ M_r 3431,88 CAS 47931-85-1

Je to syntetický polypeptid, jehož struktura odpovídá lososímu kalcitoninu I. Snižuje koncentraci vápníku v plazmě savců tím, že snižuje vyplavování vápníku z kostí. Jeho účinnost je nejméně 4000 m.j. v 1 miligramu peptidu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý lehký prášek. Je snadno rozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Aminokyseliny, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti. Látka obsahuje předepsaný podíl aminokyselin; neobsahuje alanin, methionin, fenylalanin a tryptofan.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R1*.

Zkoušený roztok. 4 mg se rozpustí ve 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové R* a *vody R* (2 + 98). Připraví se bezprostředně před použitím.

Porovnávací roztok. 2 mg *lososího kalcitoninu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové R* a *vody R* (2 + 98). Připraví se bezprostředně před použitím.

Na vrstvu se nanese po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *pyridinu R*, *vody R* a *1-butanolu R* (6 + 20 + 24 + 30) po dráze 15 cm. Vrstva se 1 h suší volně na vzduchu, potom se 10 min zahřívá při 110 °C a ještě horká vrstva se postříká čerstvě připraveným *chlornanem sodným RS* zředěným před použitím *vodou R* na koncentraci obsahující v litru 5 g aktivního chloru. Vrstva se suší v proudu studeného vzduchu tak dlouho, až na postříkané části vrstvy pod startem po nanesení kapky *škrobu s jodidem draselným RS* vzniká nejvýše velmi slabě modré zbarvení; další sušení v proudu vzduchu se zastaví. Potom se deska postříká *škrobem s jodidem draselným RS* do zřetelného objevení skvrn. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Zkoušená látka vyvolává hypokalcemii, jestliže se podává potkanům podle postupu popsaného ve zkoušce Stanovení obsahu.

Zkoušky na čistotu

Absorbance *(2.2.25)*. 2 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a měří se absorbance při 250 nm až 280 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 275 nm. Hodnota absorbance počítaná na obsah peptidu je 0,40 až 0,55. Poměr absorbance v maximu k absorbanci při 254 nm je nejméně 1,6.

Kyselina octová. Nejvýše 15 %. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *dioxanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok (a). Připraví se roztok 10 g/l.
Zkoušený roztok (b). Připraví se roztok 10 g/l s obsahem 0,1 % (*V/V*) *dioxanu R*.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok *kyseliny octové ledové R* (1 g/l) s obsahem 0,1 % (*V/V*) *dioxanu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen-kopolymerem R* (125 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C.

Aminokyseliny. Stanoví se pomocí analyzátoru aminokyselin za použití *DL-norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se kalibruje pomocí směsi obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a následujících L-aminokyselin:

lysin	serin	methionin
histidin	kyselina glutamová	isoleucin
arginin	prolin	leucin
kyselina asparagová	alanintyrosin	fenylalanin
threonin	valin	

společně s polovinou ekvimolárního množství L-cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 0,10 g *DL-norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 200,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10,0 ml.

Zkoušený roztok. 1,0 mg se smíchá v pečlivě vymyté silnostěnné zkumavce délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm s přesně odměřeným objemem roztoku vnitřního standardu obsahujícího takové množství *DL-norleucinu R*, které odpovídá polovině očekávaného obsahu zkoušené látky v molech. Zkumavka se ponoří do chladicí směsi při -5 °C a evakuuje na tlak nižší než 133 Pa. Potom se těsně uzavře a zahřívá 24 h při 110 °C až 115 °C. Po ochlazení se otevře a obsah se převede do 10ml baňky za pomoci pětkrát 0,2 ml *vody R*. Potom se obsah baňky odpaří do sucha za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R*. Zbytek se převede do vhodného *tlumivého roztoku o pH 2,2* a zředí se jím na vhodný objem.

Přesně změřený vhodný objem zkoušeného roztoku se vpraví do analyzátoru aminokyselin. Objem by měl být takový, aby výška píku nejvíce zastoupené aminokyseliny zaujímala větší část stupnice zapisovače.

Obsah každé aminokyseliny se vyjádří v molech. Relativní podíl jednotlivých aminokyselin se vypočte za předpokladu, že dvacetina molárního množství kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, prolinu, glycinu, valinu, leucinu, histidinu, argininu a lysinu se rovná jedné. Relativní obsah jednotlivých aminokyselin je v rozmezí: kyselina asparagová 1,8 až 2,2; kyselina glutamová 2,7 až 3,3; prolin 1,7 až 2,3; glycin 2,7 až 3,3; valin 0,9 až 1,1; leucin 4,5 až 5,3; histidin 0,9 až 1,1; arginin 0,9 až 1,1; lysin 1,8 až 2,2; serin 3,2 až 4,2; threonin 4,2 až 5,2; tyrosin 0,7 až 1,1; polovina množství cystinu 1,4 až 2,1.

Peptidy. Nejméně 80,0 %; za základ výpočtu slouží hodnoty získané ve zkoušce Aminokyseliny. Obsah se vypočte podle vzorce:

$$\frac{343\ 190\ (V\ .\ A)}{V_1\ .\ m},$$

v němž značí:

A - dvacetinu součtu molárního obsahu kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, prolinu, glycinu, valinu, leucinu, histidinu, argininu a lysinu získanou ve zkoušce Aminokyseliny,

m - navážku zkoušené látky v gramech,

V - objem zkoušeného roztoku,

V_1 - objem zkoušeného roztoku vpraveného do analyzátoru aminokyselin.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže počet molů norleucinu nalezených ve zkoušce Aminokyseliny korigovaný na použitý objem zkoušeného roztoku se odchyluje nejvýše o ±5 % od množství použitého pro hydrolýzu.

Příbuzné látky.

a) Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R1*.

Zkoušený roztok. Použije se čerstvě připravený zkoušený roztok uvedený ve Zkoušce totožnosti B.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *kyseliny octové R* a *vody R* (2 + 98) na 20,0 ml. Použije se čerstvě připravený roztok.

Na vrstvu se nanese po 10 μl každého roztoku do pruhů 10 mm dlouhých a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, pyridinu R, vody R* a *1-butanolu R* (4 + 24 + 30 + + 42) po dráze 15 cm. Potom se vrstva suší 1 h volně na vzduchu, 10 min se zahřívá při 110 °C a ještě horká vrstva se postříká *chlornanem sodným RS* zředěným před použitím *vodou R* na koncentraci obsahující v litru 5 g aktivního chloru a suší se v proudu studeného vzduchu tak dlouho, až na postříkané části vrstvy pod startem po nanesení kapky *škrobu s jodidem draselným RS* vzniká nejvýše velmi slabě modré zbarvení. Další sušení vzduchem se zastaví. Potom se vrstva postříká *škrobem s jodidem draselným RS* tak, aby byly pruhy skvrn zřetelně viditelné. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější, než je hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (5,0 %).

b) Provede se zónová elektroforéza *(2.2.31)* za použití pruhů vhodného gelu acetatu celulosy jako nosiče a elektrolytu, kterým je roztok obsahující 40 % (*V/V*) *formamidu R* a 60 % (*V/V*) směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R, pyridinu R* a *vody R* (1 + 25 + 225).

Zkoušený roztok. 2 mg se rozpustí v 0,2 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. 2 mg *lososího kalcitoninu CRL* se rozpustí v 0,2 ml *vody R*.

Na pruh nosiče se nanese po 1 μl každého roztoku a nechá se 1 h působit elektrické pole při napětí 17 V/cm a teplotě 5 °C. Pruh se vysuší stlačením a ponoří se do roztoku 1 g *hexakyanoželezitanu draselného R* v 50 ml *vody R*, ke kterému byly přidány 2 ml nasyceného roztoku *chloridu železitého R*. Potom se pruh odbarvuje ve směsi objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *vody R* (5 + 95) až do zesvětlení pozadí a nakonec se promyje *vodou R*. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku žádná zóna, kromě hlavní zóny, není intenzivnější než zóna na elektroforeogramu porovnávacího roztoku.

Chloridy (*2.4.4*). 0,7 mg se rozpustí v 15 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (7 %).

Voda. Nejvýše 10 %. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50 μl *methanolu bezvodého R* se zředí *2-propanolem R1* na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 2 mg se rozpustí v 0,5 ml *2-propanolu R1*.
Zkoušený roztok (b). 2 mg se rozpustí v 0,5 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 10 μl *vody R* se rozpustí v 50 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styren-divinylbenzen-kopolymerem R* (180 μm až 250 μm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- tepelně vodivostního detektoru.

Používají se suché skleněné nádoby (které mohou být silikonované) po celou dobu zkoušky.

Teplota kolony se udržuje na 114 °C, teplota detektoru na 150 °C. Nastříkne se odděleně zvolené množství každého roztoku. Vypočítá se obsah vody s předpokládanou relativní hustotou vody *(2.2.5)* při 20 °C 0,9972 g/ml a s nalezeným množstvím celkového obsahu vody v roztoku vnitřního standardu.

Kyselina octová a voda. Nejvýše 20 %. Vypočítá se z hodnot získaných ve zkouškách Kyselina octová a Voda.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví za daných podmínek porovnáním hypokalcemie, kterou tato látka vyvolává, s účinností mezinárodního referenčního přípravku lososího kalcitoninu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost deklarovaného množství mezinárodního referenčního přípravku lyofilizovaného syntetického lososího kalcitoninu s mannitolem. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Nalezená účinnost je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) nalezené účinnosti je v rozmezí 64 % až 156 % deklarované účinnosti.

Stanovení účinnosti se provede jednou z následujících metod.

Stanovení účinnosti nitrožilně. Použijí se potkani stejného pohlaví a hmotnosti 40 g až 140 g, přičemž rozdíl mezi nejlehčím a nejtěžším zvířetem je nejvýše 15 g. V noci před pokusem zvířata hladoví, ale mají volný přístup k *vodě destilované R*. V den zkoušky se zvířata namátkově rozdělí do skupin nejméně po pěti tak, aby se utvořily tři skupiny pro zkoušenou látku a tři pro referenční látku. Zvolí se tři různé dávky zkoušené a referenční látky tak, aby nejnižší dávka působila ještě měřitelné snížení a nejvyšší dávka nepůsobila maximální snížení koncentrace vápníku v plazmě. Toho může být dosaženo nejlépe tak, že je střední dávka 3x a nejvyšší dávka 9x vyšší než dávka nejnižší. Obvykle se používají dávky přibližně 1, 3 a 9 milijednotek na jedno zvíře. Množství látky na jednu dávku se rozpustí v 0,4 ml *albuminu lidského RS1*.

Se zvířaty se zachází tak, aby se vyloučil jakýkoli stres. Ocas každého zvířete se ponoří na 20 s do vody 48 °C až 50 °C teplé a do ocasní žíly se vstříkne příslušná dávka v době přibližně 5 s. Zvíře se označí podle pořadí dávky a času podání. Doba mezi injekcemi (asi 90 s až 120 s) není kratší než doba mezi následnými odběry krve.

Přesně za 1 h po podání se zvířata narkotizují vhodným těkavým anestetikem v koncentraci, která rychle způsobí ztrátu vědomí, ale ne zástavu dechu. Krev se odebere vhodnou metodou tak rychle, jak je to možné. Rychle a pečlivě se oddělí krevní plazma a obsah vápníku se stanoví metodou atomové absorpční spektrometrie *(2.2.23)*. Vhodnou statistickou metodou se vypočítá vztah mezi koncentrací vápníku a logaritmem použité dávky.

Stanovení účinnosti podkožně. Provede se jako zkouška Stanovení účinnosti nitrožilně s následujícími změnami:

- mohou se použít potkani s tělesnou hmotností až 225 g, citlivost kmenů může značně kolísat, rozdíl hmotnosti nejtěžšího a nejlehčího zvířete je nejvýše 20 g,
- dávky jsou obvykle 1, 3 a 9 milijednotek na 100 g tělesné hmotnosti zvířete. Množství zkoušené nebo referenční látky se rozpustí v *albuminu lidském RS1* tak, že dávka se podá v objemu 0,25 ml na 100 g tělesné hmotnosti,
- dávka se vstříkne podkožně.

Uchovávání

V obalech dobře uzavřených, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

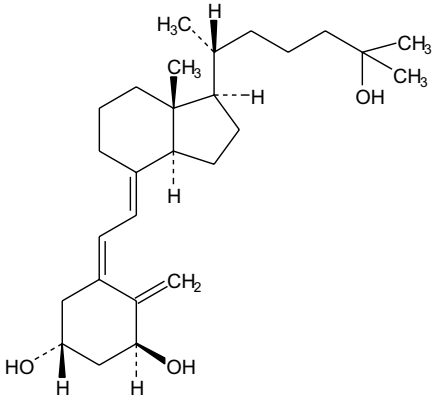
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v obalu,
- účinnost v mezinárodních jednotkách v miligramu.

†† Calcitriolum

Kalcitriol



$C_{27}H_{44}O_3$ M_r 416,64 CAS 32222-06-3

Je to (5*Z*,7*E*)-9,10-sekocholesta-5,7,10(19)-trien-1α,3β,25-triol. Obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{27}H_{44}O_3$.

Vlastnosti

Bílé nebo téměř bílé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru a v mastných olejích. Je citlivý na vzduch, teplo a světlo.

V roztoku může dojít k reverzibilní izomerizaci na prekalcitriol v závislosti na teplotě a času.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem kalcitriolu Ph. Eur.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku se retenčním časem a přibližnou velikostí shoduje s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Absorbance *(2.2.25)*. Smíchají se stejné objemové díly zkoušeného roztoku, viz Stanovení obsahu a mobilní fáze. Absorbance tohoto roztoku měřená v maximu při 265 nm je 0,38 až 0,42.

Příbuzné látky. Nejvýše 1 %; z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku, viz Stanovení obsahu, se vypočítá metodou vnitřní normalizace procentuální obsah příbuzných látek, kromě prekalcitriolu, které jsou eluovány po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času kalcitriolu.

Stanovení obsahu

Provede se co nejrychleji, za ochrany před přímým světlem a vzduchem. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 1,000 mg se rozpustí bez zahřátí v 50,0 ml mobilní fáze.
Porovnávací roztok (a). 1,000 mg *kalcitriolu CRL* se rozpustí bez zahřátí v 50,0 ml mobilní fáze.
Porovnávací roztok (b). 25 ml porovnávacího roztoku (a) se 45 min zahřívá pod *dusíkem R* ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem a potom se ochladí.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné vhodným silikagelem (3 μm až 5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *ethoxyethanolu R*, *dichlormethanu R* a *trimethylpentanu R* (45 + 275 + 680), s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 265 nm,
- injektorové smyčky.

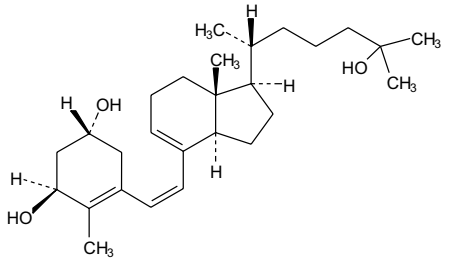
Nastříkne se 100 μl porovnávacího roztoku (b) a zaznamená se chromatogram celkem šestkrát. Pokud jsou chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, je relativní retenční čas prekalcitriolu, vztaženo ke kalcitriolu, asi 1,3. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka odezvy kalcitriolu je nejvýše 1,0 % a rozlišení mezi píkem kalcitriolu a píkem prekalcitriolu je nejméně 2,0. Je-li třeba, upraví se poměry složek mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo uvedených požadavků.

Nastříkne se 100 μl porovnávacího roztoku (a) a zaznamená se chromatogram. Nastříkne se 100 μl zkoušeného roztoku a zaznamenává se chromatogram za stejných podmínek po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku.

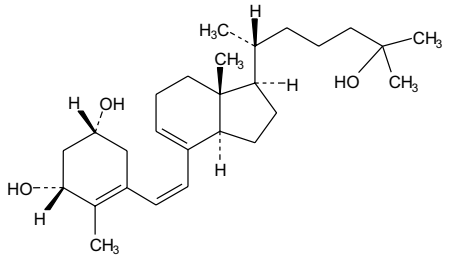
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, pod dusíkem, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.
Obsah otevřeného obalu se ihned spotřebuje.
Venenum.

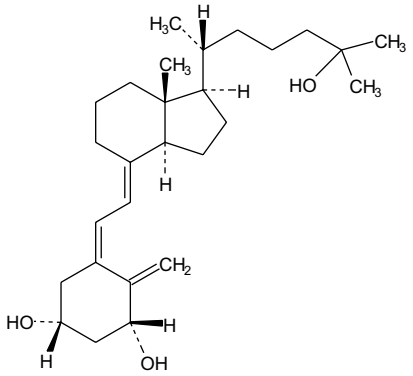
Nečistoty



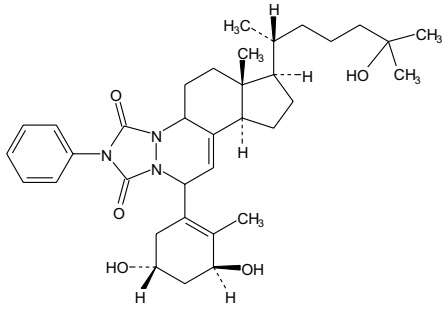
A. pre-1α,25-dihydroxycholekalciferol,



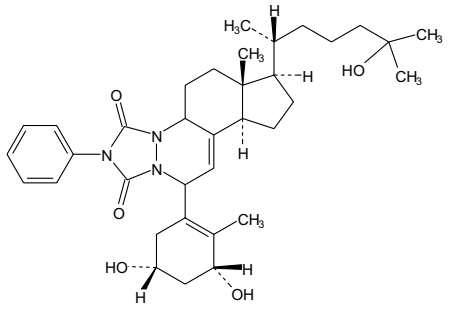
B. pre-1β,25-dihydroxycholekalciferol,



C. 1β,25-dihydroxycholekalciferol,



D. triazolinový adukt 1α-prekalcitriolu,

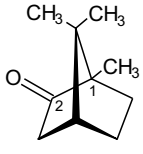


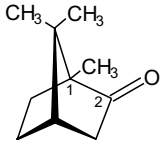
E. triazolinový adukt 1β-prekalcitriolu.

Camphora racemica

Racemický kafr

1998





$C_{10}H_{16}O$ M_r 152,24 CAS 21368-68-3

Je to (1*RS*,4*RS*)-2-bornanon.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo sypká krystalická hmota, silně těkající při pokojové teplotě. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, v etheru a v etheru petrolejovém, snadno rozpustný v mastných olejích, velmi těžce rozpustný v glycerolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 172 °C až 180 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *racemického kafru CRL*. Měří se suspenze látek v *parafinu tekutém R*.

D. 1,0 g se rozpustí v 30 ml *methanolu R* a přidá se 1,0 g *hydroxylamoniumchloridu R* a 1,0 g *octanu sodného bezvodého R*. Vaří se 2 h pod zpětným chladičem a po ochlazení se přidá 100 ml *vody R*; vznikne sraženina. Směs se zfiltruje, sraženina se promyje 10 ml *vody R* a rekrystalizuje z 10 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (4 + 6). Krystaly vysušené ve vakuu tají *(2.2.14)* při 118 °C až 121 °C.

Zkoušky na čistotu

Je nezbytné navažovat rychle.

Roztok S. 2,50 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS1;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +0,15° až -0,15°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg zkoušené látky a 50 mg *bornylacetatu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *hexanem R* na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 130 °C a teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 200 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 µl každého roztoku a citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku činila asi 80 % celé stupnice zapisovače. Zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času kafru. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím kafru a píkem bornylacetatu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 1,5 a jestliže poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) k šumu je nejméně 5. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě hlavního píku, není větší než 4 % plochy hlavního píku; plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 2 % plochy hlavního píku. Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Halogeny. 1,0 g se rozpustí v destilační baňce v 10 ml *2-propanolu R*, přidá se 1,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 50 mg *niklu Raneyova R*. Zahřívá se na vodní lázni do odpaření *2-propanolu R*. Pak se ochladí, přidá se 5 ml *vody R*, dobře se promíchá a zfiltruje se přes vlhký filtr, který byl promytý *vodou R* do negativní reakce na chloridy. Filtrát se zředí *vodou R* na 10,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidává po kapkách *kyselina dusičná R* tak dlouho, až se vzniklá sraženina opět rozpustí, a roztok se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy *(2.4.4)* (100 µg/g).

Voda. 1 g se rozpustí v 10 ml *etheru petrolejového R*; roztok je čirý *(2.2.1)*.

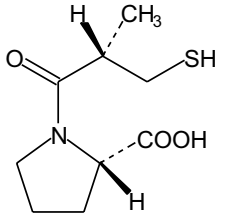
Zbytek po odpaření. Nejvýše 1 mg (0,05 %); 2,0 g se odpaří zahříváním na vodní lázni a 1 h se suší při 100 °C až 105 °C.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Captoprilum

Kaptopril



$C_9H_{15}NO_3S$ M_r 217,28 CAS 62571-86-2

Je to kyselina (2*S*)-1-[(2*S*)-3-merkapto-2-methylpropanoyl]-pyrrolidin-2-karboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_9H_{15}NO_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, v dichlormethanu a v methanolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 105 °C až 108 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *kaptoprilu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 2 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *kaptoprilu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 2 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *toluenu R* (1 + 3) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a postříká se roztokem *kyseliny 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoové) R* (20 g/l) v *methanolu R*, jehož pH bylo upraveno *amoniakem zředěným RS* na hodnotu 8. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 20 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*, pak se přidá 0,5 ml *jodu 0,05 mol/l RS;* roztok se ihned odbarví.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2., Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,0 až 2,6; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -156° až -161°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg zkoušené látky se rozpustí v mobilní fázi, přidá se 1 ml *jodu 0,05 mol/l RS* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *vody R* a *methanolu R* (0,05 + 50 + 50), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 40 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou zřetelné tři píky a rozlišení mezi posledními dvěma hlavními píky není menší než 2,0.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %), součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %). Nepřihlíží se k píkům s retenčním časem menším než 1,4 min nebo k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h ve vakuové sušárně při 60 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

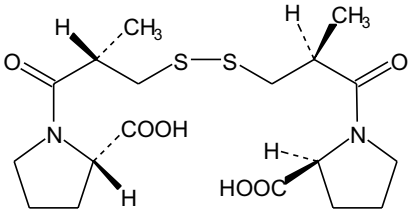
0,150 g se rozpustí v 30 ml *vody R* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) s použitím kombinované platinové elektrody.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 21,73 mg $C_9H_{15}NO_3S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

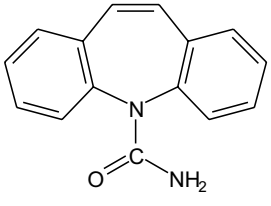
Nečistoty



A. kyselina (2*S*,2′*S*)-1,1′-{3,3′-dithiobis[(2*S*)-2-methylpropanoyl]}bis(pyrrolidin-2-karboxylová) (kaptopril-disulfid).

† Carbamazepinum

Karbamazepin



$C_{15}H_{12}N_2O$ M_r 236,27 CAS 298-46-4

Je to 5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-5-karboxamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{15}H_{12}N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v acetonu a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 189 °C až 193 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *karbamazepinu CRL*. Zkouší se látka v pevném stavu bez předchozí přípravy.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g látky se třepe 15 min s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a 0,5 ml *hydroxidu*

sodného 0,01 mol/l VS; roztok je červený. Přidá se 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je červený.

Příbuzné látky

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *chloroformu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *chloroformu R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *iminodibenzylu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *chloroformu R* a zředí se stejnou směsí na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu o velikosti 100 mm^2 se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se v komoře o velikosti odpovídající rozměru vrstvy směsí objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (14 + 90) po dráze 8 cm. Vrstva se suší 15 min na vzduchu a potom se postříká roztokem *dichromanu draselného R* (5 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS*. Žádná skvrna odpovídající iminodibenzylu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Vrstva se zahřívá 15 min až 20 min při 140 °C a potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna o R_F nižším, než má hlavní skvrna, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,01 %).

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 30,0 mg se rozpustí v 5 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). K 1,0 ml zkoušeného roztoku se přidá 5 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). K 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 25 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 6,0 mg *10,11-dihydrokarbamazepinu R* se rozpustí v 5 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (d). K 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) a 10 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 ml a vnitřního průměru 4 mm naplněné pod tlakem suspenzí silikagelu s chemicky vázanými alkoholickými hydroxylovými skupinami v *methanolu R*,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R*, *methanolu R* a roztoku *kyseliny octové bezvodé R* 0,05% *(V/V)* (5 + 5 + 90); průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (d). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem karbamazepinu a píkem 10,11-dihydrokarbamazepinu je větší než 1,5. V případě potřeby se sníží množství *acetonitrilu R* a *methanolu R* v mobilní fázi nebo se zvýší jejich objem na 7,5. Podobně lze upravit objem kyseliny octové.

Nastříkne se odděleně po 10 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 30 % celé stupnice zapisovače. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času karbamazepinu (asi 18 min). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 25 % plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto zředěného roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 285 nm.

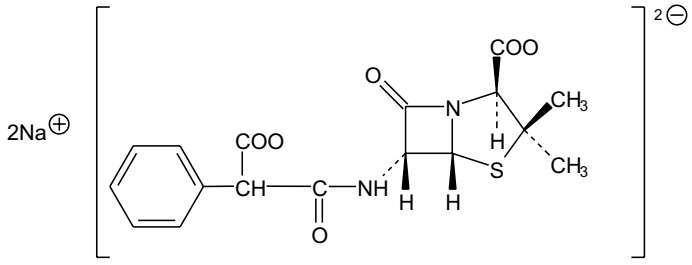
Obsah $C_{15}H_{12}N_2O$ se vypočítá pomocí specifické absorbance, jejíž hodnota je 490.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Carbenicillinum natricum

Sodná sůl karbenicilinu



$C_{17}H_{16}N_2Na_2O_6S$ M_r 422,36 CAS 4800-94-6

Je to disodná sůl kyseliny (6*R*)-6-(2-karboxy-2-fenylacetamido)penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 89,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{17}H_{16}N_2Na_2O_6S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v methanolu, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli karbenicilinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 25 mg zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli karbenicilinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *sodné soli karbenicilinu CRL* a 25 mg *sodné soli ampicilinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R*, (10 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se dají do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vznikne žlutohnědé zbarvení.

D. Zkoušená látka vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +182° až +196°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,200 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 20,0 ml.

Sodná sůl benzylpenicilinu. Nejvýše 5,0 %; stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *sodné soli karbenicilinu CRL* a 10,0 mg *sodné soli benzylpenicilinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *octanu sodného bezvodého R* (4,1 g/l), jehož hodnota pH byla předem upravena na 7,0 *kyselinou octovou zředěnou RS*, (40 + 60); průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm,
- injektorové smyčky 10 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků odpovídala nejméně polovině celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky benzylpenicilinu a karbenicilinu není menší než 5. Podle potřeby se upraví koncentrace methanolu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku benzylpenicilinu menší než 5,0 %. Nastříkne se odděleně zkoušený roztok a porovnávací roztok (a). Z ploch píků sodné soli benzylpenicilinu na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a) a z deklarovaného obsahu *sodné soli* benzylpenicilinu CRL se vypočítá obsah *sodné soli benzylpenicilinu CRL* v procentech.

Rozkladné produkty. Nejvýše 9,0 %. K 0,250 g se přidá 25 ml *vody R* a 25 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a míchá se do rozpuštění. Titruje se okamžitě *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) za použití srovnávací merkurosulfatové elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody.

Obsah rozkladných produktů v procentech (*D*) vyjádřený jako $C_{17}H_{16}N_2Na_2O_6S$ se vypočítá ze vzorce:

$$D = \frac{0,845 \cdot n}{m},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se horní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se horní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 5,5 %; stanoví se s 0,150 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,05 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a nechá se 15 min stát. Přidá se 5,0 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l RS*, 20 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a 20 ml *vody R*. Titruje se při teplotě 35 °C až 40 °C *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) za použití srovnávací merkurosulfatové elektrody a indikační platinové nebo rtuťové elektrody. Doporučuje se očistit po každém stanovení srovnávací elektrodu kyselinou dusičnou zředěnou a indikační elektrodu roztokem thiosíranu sodného (100 g/l) a poté obě elektrody opláchnout *vodou destilovanou R*. Titruje se tak pomalu, aby titrace trvala asi 15 min. Předběžná inflexe na titrační křivce se nebere v úvahu.

Obsah $C_{17}H_{16}N_2Na_2O_6S$ v procentech se počítá podle vzorce:

$$\frac{0{,}845 \ . \ n_1}{m_1} - (D + 1{,}185B),$$

v němž značí:

m_1 - navážku zkoušené látky v gramech,

n_1 - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech,

D - obsah rozkladných produktů v procentech,

B - obsah sodné soli benzylpenicilinu v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

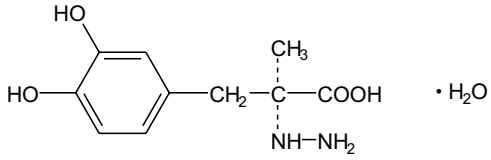
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:

- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

† Carbidopum

Karbidopa



$C_{10}H_{14}N_2O_4 \cdot H_2O$ M_r 244,25 CAS 38821-49-7

Je to monohydrát kyseliny (*S*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydrazino-2-methylpropionové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{14}N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek. Je těžce rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích minerálních kyselin.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (8,5 g/l) v *methanolu R* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (8,5 g/l) v *methanolu R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 283 nm. Specifická absorbance v maximu je 135 až 150, počítáno na vysušenou látku.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *karbidopy CRL*.

D. Asi 5 mg se 1 min intenzivně třepe s 10 ml *vody R* a pak se přidá 0,3 ml *chloridu železitého RS2*; vznikne intenzivně zelené zbarvení, které se rychle mění na červenohnědé.

E. Asi 20 mg se suspenduje v 5 ml *vody R*, přidá se 5 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se; zbarvení roztoku se mění na tmavě hnědé a vzniká červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se rozpustí v 25 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Takto připravený roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ nebo H_6 *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -22,5° až -26,5°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *chloridu hlinitém RS* za použití ultrazvukové lázně a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Hydrazin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 2,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 25 g *anexu silně zásaditého R* se převede do každé ze dvou kuželových baněk se zábrusovou zátkou. Do každé baňky se přidá 150 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 30 min se nechá stát za občasného protřepávání. Vrchní vrstva se z obou baněk slije a postup se opakuje opět se 150 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Dva 100ml odměrné válce s vnitřním průměrem 3,5 cm až 4,5 cm se označí A a B. Do válce A se převede celý obsah anexu jedné kuželové baňky za použití 60 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a do odměrného válce B se převede obsah anexu druhé kuželové baňky za použití 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Do každého válce se vloží skleněná trubička na přívod plynu, která má na konci vnitřní průměr 2 mm až 3 mm a která dosahuje téměř na dno válce. Každá směs se probublává prudkým tokem *dusíku pro chromatografii R* tak, aby vznikly homogenní suspenze. Po 30 min bez přerušení probublávání se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) do odměrného válce A. Po 1 min se přeruší probublávání v odměrném válci A a obsah válce se převede přes navlhčený filtrační papír do odměrného válce B. Po 1 min se přeruší probublávání ve válci B, roztok se převede přes navlhčený filtrační papír do čerstvě připravené směsi 1 ml roztoku *salicylaldehydu R* (200 g/l) v *methanolu R* a 20 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 5,5* v kuželové baňce, 1 min se důkladně třepe a 15 min se zahřívá ve vodní lázni při 60 °C. Vznikne čirá tekutina. Ochladí se, přidají se 2,0 ml *toluenu R* a 2 min se silně třepe. Obsah baňky se převede do centrifugační zkumavky a centrifuguje se.

Toluenová vrstva se oddělí, převede se do 100ml dělicí nálevky a protřepe se silně dvakrát 20 ml roztoku *disiřičitanu sodného R* (200 g/l) a nakonec ještě dvakrát 50 ml *vody R.* Toluenová vrstva se oddělí.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *hydraziniumsulfatu R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 50 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). Připraví se současně stejným způsobem jako zkoušený roztok (b) za použití 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) místo 1,0 ml zkoušeného roztoku (a).

Na vrstvu se nanese 10 µl zkoušeného roztoku (b) a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 2) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Žádná žlutě fluoreskující skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (20 µg/g hydrazinu).

Methyldopa a methylkarbidopa. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29).*

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *methylkarbidopy CRL* a 5 mg *methyldopy CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *karbidopy CRL* a 5 mg *methyldopy CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),

- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (14 g/l) (2 + 98) s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 282 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se po 20 µl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím methyldopě a píkem odpovídajícím karbidopě na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je větší než 4,0. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plochy píků odpovídajících methyldopě a methylkarbidopě nejsou větší než plochy odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 6,9 % až 7,9 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí mírným zahřátím v 75 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,62 mg $C_{10}H_{14}N_2O_4$.

Uchovávání

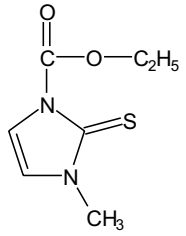
V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Separandum.

---

† Carbimazolum

Karbimazol



$C_7H_{10}N_2O_2S$ M_r 186,23 CAS 22232-54-8

Je to ethylester kyseliny 3-methyl-2-thioxo-4-imidazolin-1-karboxylové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_7H_{10}N_2O_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 122 °C až 125 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *karbimazolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Thiamazol a jiné příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí ve směsi 50 ml *vody R* a 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a přidá se 1 ml *jodobismutitanu draselného RS*; vznikne červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Thiamazol a jiné příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *karbimazolu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *thiamazolu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *dichlormethanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se 30 min suší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající thiamazolu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající thiamazolu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 24 h v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

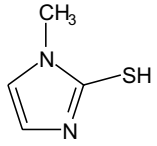
Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 291 nm. Vypočítá se obsah $C_7H_{10}N_2O_2S$ za použití specifické absorbance, jejíž hodnota je 557.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Nečistoty



A. 1-methyl-1*H*-imidazol-2-thiol (thiamazol).

Carbo activatus

Aktivní uhlí

Synonyma. Carbo adsorbens, Carbo medicinalis, adsorpční uhlí, medicinální uhlí

C A_r 12,01 CAS 7440-44-0

Získává se z rostlinných materiálů vhodným karbonizačním postupem, kterým se dosáhne zvýšené adsorpční schopnosti.

Vlastnosti

Černý lehký prášek bez hrudek. Je prakticky nerozpustné ve všech běžných rozpouštědlech.

Zkoušky totožnosti

A. V červeném žáru hoří pomalu bez plamene.

B. Zkouška Adsorpční mohutnost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 2,0 g v kuželové baňce se zábrusem se přidá 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, vaří se 1 h pod zpětným chladičem a zfiltruje se. Filtr se promyje *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a spojené filtráty se odpaří na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 2,0 g se přidá 40 ml *vody R* a 5 min se vaří. Po ochlazení se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na původní objem a zfiltruje se. Prvních 20 ml se odstraní. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1* a 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS;* roztok je modrý. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,75 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS.*

Látky rozpustné v kyselinách. K 1,0 g se přidá 25 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 5 min se vaří. Směs se za horka zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (10) a promyje se 10 ml horké *vody R.* Spojené filtráty se odpaří do sucha na vodní lázni. Ke zbytku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, znovu se odpaří do sucha a suší se do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 30 mg (3 %).

Barevné látky rozpustné v zásadách. K 0,25 g se přidá 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 1 min se vaří. Po ochlazení se zfiltruje a zředí se *vodou R* na 10 ml. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $ZŽ_4$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Látky rozpustné v lihu 96%. K 2,0 g se přidá 50 ml *lihu 96% R* a vaří se 10 min pod zpětným chladičem. Směs se ihned zfiltruje, ochladí a zředí se *lihem 96% R* na 50 ml. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ nebo $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*. 40 ml roztoku se odpaří do sucha a suší se do konstantní hmotnosti při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 8 mg (0,5 %).

Fluoreskující látky. 10,0 g se v zařízení pro diskontinuální extrakci extrahuje 2 h 100 ml *cyklohexanu R1*. Spojené výtřepky se zředí *cyklohexanem R1* na 100 ml a pozorují se v ultrafialovém světle při 365 nm. Fluorescence tohoto roztoku není intenzivnější než fluorescence porovnávacího roztoku obsahujícího 83 μg *chininu R* v 1000 ml *kyseliny sírové 0,005 mol/l RS* zkoušeného za stejných podmínek.

Sulfidy. K 1,0 g v kuželové baňce se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, 20 ml *vody R* a zahřeje se k varu. Unikající páry nezbarví *papír s octanem olovnatým R* do hněda.

Měď. Nejvýše 25 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok S.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku mědi (0,1 % Cu)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 325,0 nm za použití měděné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Olovo. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok S.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen. V závislosti na přístroji lze použít i rezonanční čáru při 217,0 nm.

Zinek. Nejvýše 25 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok S.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku zinku (100 μg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 214,0 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 15 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 120 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Adsorpční mohutnost. K 0,300 g ve 100ml kuželové baňce se zábrusovou zátkou se přidá 25,0 ml čerstvě připraveného roztoku *fenazonu R* (10 g/l) ve vodě, 15 min se důkladně třepe a zfiltruje se. Prvních 5 ml filtrátu se odstraní a k 10,0 ml filtrátu se přidá 1,0 g *bromidu draselného R* a 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Za použití 0,1 ml *ethoxychrysoidiniumchloridu RS* jako indikátoru se titruje *bromičnanem draselným 0,0167 mol/l VS* do změny červenorůžového zbarvení na žlutorůžové. Před koncem titrace se titruje pomalu (1 kapka/15 s). Provede se slepá zkouška za použití 10,0 ml roztoku fenazonu.

Množství fenazonu adsorbovaného 100 g adsorpčního uhlí se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{2{,}353(a - b)}{m},$$

v němž značí:
a - spotřebu *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* ve slepé zkoušce v mililitrech,
b - spotřebu *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* na titraci zkoušené látky v mililitrech,
m - navážku zkoušené látky v gramech.

100 g zkoušené látky adsorbuje nejméně 40 g fenazonu, počítáno na vysušenou látku.

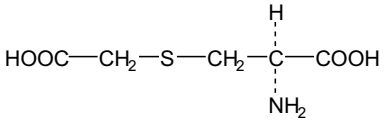
Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Carbocisteinum

Karbocystein



$C_5H_9NO_4S$ M_r 179,19 CAS 2387-57-9

Je to kyselina (*R*)-2-amino-3-[(karboxymethyl)thio]propanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 %.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných roztocích minerálních kyselin.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *karbocysteinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,1 g se rozpustí ve 4,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 min se zahřívá na vodní lázni. Ochladí se a přidá se 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (25 g/l); vznikne tmavě červené zbarvení, které se během několika minut změní na hnědé a potom na žluté.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,00 g se disperguje ve 20 ml *vody R* a za míchání se po kapkách přidá 2,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. pH se upraví na hodnotu 6,3 pomocí *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH. 2,8 až 3,0; měří se suspenze připravená protřepáním 0,2 g s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -32,5° až -35,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v 2 ml *amoniaku zředěného RS2* a zředí se *vodou R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *karbocysteinu CRL* se rozpustí ve 2 ml *amoniaku zředěného RS2* a zředí se *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *karbocysteinu CRL* a 10 mg *argininiumchloridu CRL* se rozpustí 5 ml *amoniaku zředěného RS2* a zředí se *vodou R* na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku, nechá se vysušit na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu, postříká *ninhydrinem RS* a potom se zahřívá 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 33 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,15 %), bez dalšího přidání *kyseliny dusičné zředěné RS*.

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* mírným zahřátím a za míchání do úplného rozpuštění. Přidá se 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,92 mg $C_5H_9NO_4S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Carbonei dioxidum

1998

Oxid uhličitý

Synonymum. Carboneum dioxydatum

CO_2 M_r 44,01 CAS 124-38-9

Obsahuje nejméně 99,5 % *(V/V)* sloučeniny CO_2 v plynné fázi.

Vlastnosti

Bezbarvý plyn. Při 20 °C a tlaku 101 kPa se 1 objemový díl plynu rozpustí v asi 1 objemovém dílu vody.

Výroba

Zkouší se plynná fáze.

Pokud se zkouška provádí s tlakovou lahví, ponechá se lahev se zkoušeným plynem nejméně 6 h při pokojové teplotě ve vertikální poloze s vypouštěcím ventilem nahoře.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.

Porovnávací plyn. Směs obsahující 5 ml/m^3 *oxidu uhelnatého R* v *oxidu uhličitém R1*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 2 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné vhodným molekulovým sítem pro chromatografii (0,5 nm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 60 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru s methanizérem.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 130 °C.

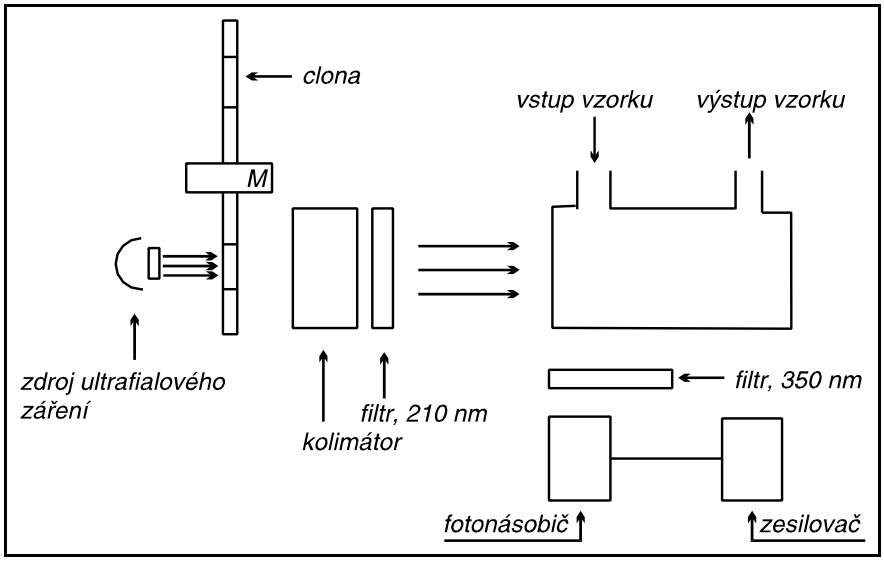
Nastříkne se zkoušený plyn a porovnávací plyn. Nastříknutý objem a pracovní podmínky se nastaví tak, aby výška hlavního píku oxidu uhelnatého na chromatogramu porovnávacího plynu byla nejméně 35 % celé stupnice zapisovače.

Obsah oxidu uhelnatého se vypočítá z plochy píku oxidu uhelnatého na chromatogramu porovnávacího plynu.

Oxid dusnatý a oxid dusičitý. Celkem nejvýše 2 ml/m^3; stanoví se za použití chemiluminiscenčního analyzátoru *(2.5.26)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací plyn (a). *Oxid uhličitý R1.*
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 2 ml/m^3 *oxidu dusnatého R* v *oxidu uhličitém R1.*

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu dusnatého a oxidu dusičitého ve zkoušeném plynu.



Obr. 1. Ultrafialový fluorescenční analyzátor

Celková síra. Nejvýše 1 ml/m^3, počítáno jako oxid siřičitý; stanoví se za použití ultrafialového fluorescenčního analyzátoru oxidací sirných sloučenin (obrázek 1) zahřátím na 1000 °C.

Zařízení se skládá:
- z přístroje emitujícího ultrafialové záření o vlnové délce 210 nm, sestaveného z ultrafialové lampy, kolimátoru a selektivního filtru; paprsek je periodicky přerušován clonou rotující velkou rychlostí,
- z reakční komory, kterou proudí předem přefiltrovaný zkoušený plyn,
- z přístroje detegujícího záření emitované při 350 nm, sestaveného ze selektivního filtru, fotonásobiče a zesilovače.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací plyn (a). *Oxid uhličitý R1.*
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 0,5 ml/m^3 až 2 ml/m^3 *sirovodíku R* v *oxidu uhličitém R1.*

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Zkoušený plyn se nechá projít křemennou pecí zahřátou na 1000 °C, ve které proudí *kyslík R* rychlostí desetkrát menší, než je rychlost zkoušeného plynu. Změří se obsah oxidu siřičitého v plynných směsích vycházejících z pece.

Voda. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití elektrolytického hygrometru *(2.5.28)*.

Stanovení obsahu. Stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.24)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.
Porovnávací plyn (a). Oxid uhličitý R1.
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 95,0 % *(V/V) oxidu uhličitého R1* a 5,0 % *(V/V) dusíku R1*.

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhličitého ve zkoušeném plynu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. pro oxid uhličitý.*

B. Doutnající dřevěná tříska se umístí do atmosféry zkoušeného plynu; tříska zhasne.

C. Zkoušený plyn se zavádí do *hydroxidu barnatého RS;* vylučuje se bílá sraženina, která se rozpouští za šumění v *kyselině octové zředěné RS.*

Zkoušky na čistotu

Zkouší se plynná fáze.

Pokud se zkouška provádí s tlakovou lahví, ponechá se lahev se zkoušeným plynem nejméně 6 h při pokojové teplotě ve vertikální poloze s vypouštěcím ventilem nahoře.

Oxid dusnatý a oxid dusičitý. Nejvýše 2 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu dusnatého a oxidu dusičitého *(2.1.6)*.

Oxid siřičitý. Nejvýše 2 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu siřičitého *(2.1.6)*.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhelnatého *(2.1.6)*.

Sirovodík. Nejvýše 1 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci sirovodíku *(2.1.6)*.

Vodní pára. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci vodní páry *(2.1.6)*.

Uchovávání

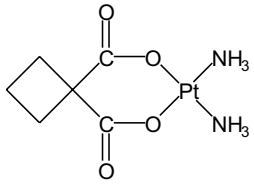
Zkapalněný pod tlakem ve vhodných obalech vyhovujících ČSN 07 8510.

Nečistoty

A. oxid dusnatý,
B. oxid dusičitý,
C. oxid uhelnatý,
D. celková síra,
E. voda.

† Carboplatinum

Karboplatina



$C_6H_{12}N_2O_4Pt$ M_r 371,25 CAS 41575-94-4

Je to *cis*-diammin[1,1-cyklobutandikarboxylato(2-)-O,O′]platnatý komplex. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_6H_{12}N_2O_4Pt$.

Vlastnosti

Bezbarvý krystalický prášek. Je mírně rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v acetonu a v lihu 96%.

Taje při asi 200 °C za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem karboplatiny Ph. Eur.*

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Roztok S2. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R*, v případě potřeby za mírného zahřívání, a zředí se jí na 40 ml. Je-li třeba, zfiltruje se.

Vzhled roztoku. Roztok S1 je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S1 se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS1;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,7 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 20,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem aminopropylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (130 + 870), s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- injektorové smyčky, 10 μl,

- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se zkoušený roztok. Zkoušku lze hodnotit, jestliže:

- hmotnostní rozdělovací poměr D_m není menší než 4,0,
- počet teoretických pater *n* není menší než 5000,
- asymetrie píku není větší než 2,0.

Je-li třeba, upraví se obsah acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se zkoušený a porovnávací roztok a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Chloridy (*2.4.4*). 10 ml roztoku S2 se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*.

Amonium (*2.4.1*). 0,20 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (100 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 0,2 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4 /ml)*.

Stříbro. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v roztoku *kyseliny dusičné R* 1% (*V/V*) a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku stříbra (5 μg Ag/ml)* zředěného roztokem *kyseliny dusičné R* 1% (*V/V*).

Změří se emisní intenzita při 328,1 nm.

Rozpustné baryum. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok popsaný ve zkoušce Stříbro.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku barya (50 μg Ba/ml)* zředěného roztokem *kyseliny dusičné R* 1% (*V/V*). Změří se emisní intenzita při 455,4 nm.

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S2 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

Stanoví se s 0,200 g zbytku získaného ve zkoušce Ztráta sušením, který se žíhá při 800 °C do konstantní hmotnosti.

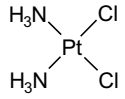
1 mg zbytku odpovídá 1,903 mg $C_6H_{12}N_2O_4Pt$.

Uchovávání

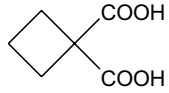
V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Separandum.

Nečistoty



A. cisplatina,



B. kyselina 1,1-cyklobutandikarboxylová.

Carboxymethylamylum natricum A

Sodná sůl karboxymethylškrobu (typ A)

CAS 9063-38-1

Je to sodná sůl příčně síťovaného, částečně O-karboxymethylovaného bramborového škrobu. Počítáno na látku promytou lihem 80% *(V/V)* a vysušenou, obsahuje 2,8 % až 4,2 % Na (A_r 22,99).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný sypký prášek, velmi hygroskopický. Je prakticky nerozpustná v dichlormethanu. S vodou tvoří průsvitnou suspenzi.

Pozoruje se pod mikroskopem. Obsahuje zrna nepravidelného tvaru, vejčitá nebo hruškovitá o průměru 30 μm až 100 μm nebo okrouhlá o průměru 10 μm až 35 μm. Občas jsou shloučena do skupin po dvou až čtyřech. Zrna mají nepravidelnou mimostředovou trhlinu a zřetelné soustředěné vrstvení. V polarizovaném světle se středová trhlina jeví jako černý kříž. Na povrchu zrn jsou patrné malé krystaly. Zrna ve vodě silně bobtnají.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Hodnota pH, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 4,0 g se třepou bez zahřátí s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*; vznikne gel. Přidá se 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a protřepe se; vznikne suspenze, která stáním sedimentuje.

C. K 5 ml suspenze získané ve Zkoušce totožnosti B se přidá 0,05 ml *jodu RS1;* vznikne tmavě modré zbarvení.

D. Roztok S2, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. Suspenze získaná ve Zkoušce totožnosti B se centrifuguje 10 min při 2500 g_n. Supernatantní tekutina se opatrně sleje.

Roztok S2. K 2,5 g v křemenném nebo platinovém kelímku se přidají 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* (500 g/l), směs se zahřívá na vodní lázni, potom opatrně nad volným plamenem tak, aby se teplota postupně zvyšovala, a pak se spaluje v muflové peci při (600 ± 25) °C do vymizení všech černých částic. Po ochlazení se přidá několik kapek *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se a spaluje znovu. Po ochlazení se přidá několik kapek *uhličitanu amonného RS*, odpaří se do sucha a opatrně spálí. Po ochlazení se zbytek rozpustí v 50 ml *vody R*.

Vzhled roztoku. Roztok S1 je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 7,5; měří se roztok S1.

Glykolan sodný. Nejvýše 2,0 %. *Zkouška se provádí za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. K 0,20 g v kádince se přidá 5 ml *kyseliny octové R* a 5 ml *vody R*. Míchá se do rozpuštění (asi 10 min), přidá se 50 ml *acetonu R* a 1 g *chloridu sodného R*. Zfiltruje se přes pevný filtrační papír impregnovaný *acetonem R*. Kádinka a filtr se promyjí *acetonem R*, promývací tekutina se spojí s filtrátem a zředí se *acetonem R* na 100,0 ml. Roztok se bez třepání nechá stát 24 h. Použije se čirá supernatantní tekutina.
Porovnávací roztok. 0,310 g *kyseliny glykolové R* předem vysušené ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *kyseliny octové R* a nechá se stát asi 30 min. Pak se přidá 50 ml *acetonu R*, 1 g *chloridu sodného R* a zředí se *acetonem R* na 100,0 ml.

2,0 ml zkoušeného roztoku se zahřívají 20 min na vodní lázni. Ochladí se na pokojovou teplotu, přidá 20,0 ml *2,7-dihydroxynaftalenu RS*, protřepe se a zahřívá 20 min ve vodní lázni. Pak se ochladí pod tekoucí vodou, převede se do odměrné baňky a zředí se *kyselinou sírovou R* na 25,0 ml. Baňka se stále drží pod tekoucí vodou. Po 10 min se měří absorbance při 540 nm *(2.2.25)* za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance tohoto roztoku není větší než absorbance roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 2,0 ml porovnávacího roztoku (2,0 %).

Chlorid sodný. Nejvýše 7,0 %. 1,00 g se 10 min třepe s 20 ml *lihu R* 80% *(V/V)* a zfiltruje se. Vytřepávání se opakuje čtyřikrát. Zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C a uchová se pro zkoušku Stanovení obsahu. Filtráty se spojí, odpaří do sucha, zbytek se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 30 ml *vody R* a 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití stříbrné indikační elektrody.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,844 mg NaCl.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S2 vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Mikrobiální znečištění. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella (2.6.13)*.

Stanovení obsahu

K 0,500 g suchého rozdrceného zbytku získaného ve zkoušce Chlorid sodný, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 80 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 2 h se zahřívá pod zpětným chladičem. Po ochlazení na pokojovou teplotu se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,299 mg Na.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Carboxymethylamylum natricum B

Sodná sůl karboxymethylškrobu (typ B)

CAS 9063-38-1

Je to sodná sůl příčně síťovaného, částečně O-karboxymethylovaného bramborového škrobu. Počítáno na látku promytou lihem 80% *(V/V)* a vysušenou, obsahuje 2,0 % až 3,4 % Na (A_r 22,99).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný sypký prášek, velmi hygroskopický. Je prakticky nerozpustná v dichlormethanu. S vodou tvoří průsvitnou suspenzi.

Pozoruje se pod mikroskopem. Obsahuje zrna nepravidelného tvaru, vejčitá nebo hruškovitá o průměru 30 μm až 100 μm nebo okrouhlá o průměru 10 μm až 35 μm. Občas jsou shloučena do skupin po dvou až čtyřech. Zrna mají nepravidelnou mimostředovou trhlinu a zřetelné soustředěné vrstvení. V polarizovaném světle se středová trhlina jeví jako černý kříž. Na povrchu zrn jsou patrné malé krystaly. Zrna ve vodě silně bobtnají.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Hodnota pH, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 4,0 g se třepou bez zahřátí s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*; vznikne gel. Přidá se 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a protřepe se; vznikne suspenze, která stáním sedimentuje.

C. K 5 ml suspenze, získané ve Zkoušce totožnosti B, se přidá 0,05 ml *jodu RS1*; vznikne tmavě modré zbarvení.

D. Roztok S2, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. Suspenze získaná ve Zkoušce totožnosti B se 10 min centrifuguje při 2500 g_n. Supernatantní tekutina se opatrně sleje.

Roztok S2. K 2,5 g v křemenném nebo platinovém kelímku se přidají 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* (500 g/l), směs se zahřívá na vodní lázni, potom opatrně nad volným plamenem tak, aby se teplota postupně zvyšovala, a pak se spaluje v muflové peci při (600 ± 25) °C do vymizení všech černých částic. Po ochlazení se přidá několik kapek *kyseliny sírové zředěné RS* a znovu se zahřívá a spaluje. Po ochlazení se přidá několik kapek *uhličitanu amonného RS*, odpaří se do sucha a opatrně spálí. Po ochlazení se zbytek rozpustí v 50 ml *vody R*.

Vzhled roztoku. Roztok S1 je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 5,0; měří se roztok S1.

Glykolan sodný. Nejvýše 2,0 %. *Zkouška se provádí za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. K 0,20 g v kádince se přidá 5 ml *kyseliny octové R* a 5 ml *vody R*. Míchá se do rozpuštění (asi 10 min), přidá se 50 ml *acetonu R* a 1 g *chloridu sodného R*. Zfiltruje se přes pevný filtrační papír impregnovaný *acetonem R*. Kádinka a filtr se promyjí *acetonem R*, promývací tekutina se spojí s filtrátem a zředí *acetonem R* na 100,0 ml. Roztok se bez třepání nechá stát 24 h. Použije se čirá supernatantní tekutina.
Porovnávací roztok. 0,310 g *kyseliny glykolové R* předem vysušené ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *kyseliny octové R* a nechá se stát asi 30 min. Pak se přidá 50 ml *acetonu R*, 1 g *chloridu sodného R* a zředí se *acetonem R* na 100,0 ml.

2,0 ml zkoušeného roztoku se zahřívá 20 min na vodní lázni. Ochladí se na pokojovou teplotu, přidá 20,0 ml *2,7-dihydroxynaftalenu RS*, protřepe se a zahřívá 20 min ve vodní lázni. Pak se ochladí pod tekoucí vodou, převede se do odměrné baňky a zředí se *kyselinou sírovou R* na 25,0 ml. Baňka se stále drží pod tekoucí vodou. Po 10 min se měří absorbance při 540 nm *(2.2.25)* za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance tohoto roztoku není větší než absorbance roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 2,0 ml porovnávacího roztoku (2,0 %).

Chlorid sodný. Nejvýše 7,0 %; 1,00 g se 10 min třepe s 20 ml *lihu R* 80% *(V/V)* a zfiltruje se. Vytřepávání se opakuje čtyřikrát. Zbytek se vysuší do konstantní hmotnosti při 100 °C a uchová se pro zkoušku Stanovení obsahu. Filtráty se spojí, odpaří se do sucha, zbytek se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 30 ml *vody R* a 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití stříbrné elektrody jako indikační.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,844 mg NaCl.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S2 vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Mikrobiální znečištění. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella (2.6.13)*.

Stanovení obsahu

K 0,500 g suchého rozdrceného zbytku získaného ve zkoušce Chlorid sodný se přidá 80 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 2 h se zahřívá pod zpětným chladičem. Po ochlazení na pokojovou teplotu se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,299 mg Na.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Carmellosum calcicum

Vápenatá sůl karmelosy

Synonymum. Vápenatá sůl karboxymethylcelulosy

CAS 9050-04-8

Je to vápenatá sůl částečně O-karboxymethylované celulosy. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 6,0 % vápníku (Ca; A_r 40,80) ve zbytku po stanovení síranového popela. Může obsahovat nejvýše 0,6 % oxidu křemičitého (SiO_2).

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek, po vysušení hygroskopický. Je prakticky nerozpustná v acetonu, v lihu 96%, v etheru a v toluenu. Ve vodě bobtná a tvoří suspenzi.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se důkladně protřepe s 10 ml *vody R*, přidá se 12 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a nechá se 10 min stát (roztok A). 1 ml roztoku A se zředí *vodou R* na 5 ml. K 0,05 ml se přidá 0,5 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (0,5 g/l) v roztoku *kyseliny sírové R* (75%) a 10 min se zahřívá na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

B. 5 ml roztoku A získaného ve Zkoušce totožnosti A se třepe s 10 ml *acetonu R;* vznikne bílá vločkovitá sraženina.

C. 1 g se spálí a zbytek se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny octové R* a 10 ml *vody R*. V případě potřeby se roztok zfiltruje a filtrát se několik minut povaří. Po ochlazení se zneutralizuje *amoniakem zředěným RS1*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na vápník *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se třepe s 50 ml *vody destilované R*, přidá se 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 100 ml.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,0; měří se suspenze připravená třepáním 1 g se 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po dobu 5 min.

Oxid křemičitý. Nejvýše 0,6 %. Ke zbytku získanému ve zkoušce Síranový popel, viz Zkoušky na čistotu, se přidá tolik *lihu 96% R*, aby byl zbytek dokonale zvlhčen. Potom se přidá po malých dávkách 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R* a odpaří se opatrně do sucha při 95 °C až 105 °C tak, aby se zabránilo ztrátám prskáním. Po chlazení se stěny platinového kelímku omyjí 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R*, přidá se 0,5 ml *kyseliny sírové R* a odpaří se do sucha. Za postupného zvyšování teploty se zbytek spálí při 900 °C, pak se ochladí v exsikátoru a zváží se. Rozdíl mezi hmotností zbytku získaného ve zkoušce Síranový popel a hmotností konečného zbytku odpovídá množství oxidu křemičitého.

Chloridy *(2.4.4)*. 20 ml roztoku S se zahřívá na vodní lázni s 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, dokud se nevytvoří sraženina. Po ochlazení se odstředí a slije se supernatantní tekutina. Sraženina se promyje třikrát 10 ml *vody R* a pokaždé se znovu odstředí. Supernatantní tekutina se spojí s promývacími tekutinami a zředí se *vodou R* na 100 ml. K 25 ml tohoto roztoku se přidá 6 ml

kyseliny dusičné zředěné RS a zředí se *vodou R* na 50 ml. 10 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,5 %).

Sírany *(2.4.8)*. 20 ml roztoku S se zahřívá na vodní lázni s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, dokud se nevytvoří sraženina. Po ochlazení se odstředí a slije se supernatantní tekutina. Sraženina se promyje třikrát 10 ml *destilované vody R* a pokaždé se znovu odstředí. Supernatantní tekutina se spojí s promývacími tekutinami a zředí se *vodou destilovanou R* na 100 ml. K 25 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. 10,0 % až 20,0 %, počítá se na vysušenou látku; stanoví se s 1,000 g v platinovém kelímku. Látka se zvlhčí směsí stejných objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Carmellosum natricum

Sodná sůl karmelosy

Synonyma. Carboxymethylcellulosum natricum, Carboxymethylcellulosum solubile, sodná sůl karboxymethylcelulosy

CAS 9004-32-4

Je to sodná sůl částečně O-karboxymethylované celulosy. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 6,5 % až 10,8 % sodíku (Na; A_r 22,99).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý zrněný prášek, po vysušení hygroskopický. Je prakticky nerozpustná v acetonu, v lihu 96%, v etheru a v toluenu. Snadno se disperguje ve vodě za vzniku koloidních roztoků.

Zkoušky totožnosti

A. K 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *síranu měďnatého RS*; vznikne modrá sraženina podobající se bavlně.

B. 5 ml roztoku S se několik minut vaří; nevznikne žádná sraženina.

C. Roztok připravený ze síranového popela podle zkoušky Těžké kovy, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství zkoušené látky odpovídající 1,0 g vysušené látky se nasype do 90 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* 40 °C až 50 °C teplé a silně se promíchá. Míchá se do vzniku koloidního roztoku, ochladí se a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,0; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita *(2.2.10)*. Nejméně 75 % a nejvýše 140 % hodnoty uvedené v označení na obalu. Množství zkoušené látky odpovídající 2,00 g vysušené látky se za míchání přidá do 50 ml *vody R* zahřáté na 90 °C. (U látek s nižší viskozitou se použije, je-li to třeba, odpovídající množství podle deklarace na štítku.) Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100,0 ml a míchá se do úplného rozpuštění. Měří se viskozita tohoto roztoku na rotačním viskozimetru při 20 °C a při smykovém poměru 10 s^{-1}. Jestliže není možné přesně dosáhnout smykového poměru 10 s^{-1}, použijí se hodnoty o něco vyšší a o něco nižší a interpoluje se.

Glykolan sodný. Množství zkoušené látky odpovídající 0,500 g vysušené látky se převede do kádinky. Přidá se 5 ml *kyseliny octové R*, 5 ml *vody R* a míchá se do úplného rozpuštění (asi 30 min). Přidá se 80 ml *acetonu R*, 2 g *chloridu sodného R* a zfiltruje se přes řídký filtrační papír navlhčený *acetonem R* do odměrné baňky. Kádinka a filtr se promyjí *acetonem R* a filtrát se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Nechá se 24 h stát bez třepání. Čirá supernatantní tekutina se použije jako zkoušený roztok.

V odměrné baňce se rozpustí ve *vodě R* 0,310 g *kyseliny glykolové R* předem vysušené ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* a zředí se jí na 1000,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se dá do odměrné baňky, přidá se 5 ml *kyseliny octové R* a nechá se 30 min stát. Přidá se 80 ml *acetonu R*, 2 g *chloridu sodného R* a zředí se *acetonem R* na 100,0 ml. Tento roztok se použije jako porovnávací roztok.

2,0 ml každého roztoku se převede odděleně do odměrných baněk a baňky se zahřejí na vodní lázni, aby se odstranil aceton. Po ochlazení na pokojovou teplotu se přidá po 5,0 ml *2,7-dihydroxynaftalenu RS*, promíchá se a přidá se ještě 15,0 ml *2,7-dihydroxynaftalenu RS*. Baňky se uzavřou hliníkovou fólií a 20 min se zahřívají ve vodní lázni. Potom se ochladí pod tekoucí vodou a zředí se *kyselinou sírovou R* na 25,0 ml. Do 10 min se přenese odděleně 10,0 ml obou roztoků do zkumavek s plochým dnem a roztoky se pozorují vertikálním směrem. Zkoušený roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok (0,4 % glykolanu sodného).

Chloridy *(2.4.4)*. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,25 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. Ke zbytku získanému ve zkoušce Síranový popel se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a odpaří se na vodní lázni. Zbytek se rozpustí ve 20 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. 20,0 % až 33,3 %; stanoví se s 1,00 g za použití směsi stejných objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R*, počítáno na vysušenou látku. Rozmezí síranového popela odpovídá obsahu 6,5 % až 10,8 % sodíku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- hodnota zdánlivé viskozity roztoku 20 g/l v milipascalsekundách; pro látku s nižší zdánlivou viskozitou se uvede koncentrace roztoku a zdánlivá viskozita v milipascalsekundách,
- že látka není určena pro parenterální použití.

Carmellosum natricum conexum

Sodná sůl kroskarmelosy

Synonyma. Carboxymethylcellulosum natricum conexum, Croscarmellosum natricum

Je to sodná sůl příčně síťované, částečně O-karboxymethylované celulosy. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 5,0 % až 9,0 % sodíku (Na; A_r 22,99).

Vlastnosti

Bílý nebo našedlý prášek. Je prakticky nerozpustná v acetonu, v ethanolu, v etheru a v toluenu.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se třepe s 10 ml *vody R*; vznikne gel.

B. 1 g se třepe se 100 ml roztoku *modři methylenové R* (4 μg/ml) a pak se směs nechá usadit. Zkoušená látka absorbuje methylenovou modř a usadí se jako modrá želatinózní hmota.

C. 1 g se třepe s 50 ml *vody R*. 1 ml směsi se přenese do zkumavky, přidá se 1 ml *vody R* a 0,05 ml čerstvě připraveného roztoku *1-naftolu R* (40 g/l) v *methanolu R*. Zkumavka se nakloní a po vnitřní stěně se opatrně přidají 2 ml *kyseliny sírové R* tak, aby se vytvořila spodní vrstva; na rozhraní vrstev vznikne červenofialové zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,0; měří se suspenze připravená třepáním 1 g se 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po dobu 5 min.

Chlorid sodný a glykolan sodný. Součet obsahu chloridu sodného a glykolanu sodného v procentech není větší než 1,0 %, počítáno na vysušenou látku.

Chlorid sodný. 5,00 g se převede do 250ml kuželové baňky, přidá se 50 ml *vody R*, 5 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného RS* a zahřívá se 20 min na vodní lázni za občasného protřepání, aby nastala úplná hydratace. Po ochlazení se přidá 100 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny dusičné R* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,05 mol/l VS* za stálého míchání a potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) za použití stříbrné elektrody jako indikační a dvojité srovnávací elektrody

obsahující roztok *dusičnanu draselného R* (100 g/l) ve vnějším plášti a naplněné standardním roztokem ve vnitřním plášti.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,05 mol/l VS* odpovídá 2,922 mg NaCl.

Glykolan sodný. Množství odpovídající 0,250 g vysušené látky se převede do kádinky, přidá se 5 ml *kyseliny octové ledové R* a 5 ml *vody R*. Míchá se, aby nastala úplná hydratace (asi 30 min). Pak se přidá 80 ml *acetonu R* a 2 g *chloridu sodného R*. Míchá se několik minut do úplného vysrážení karboxymethylcelulosy. Směs se zfiltruje do odměrné baňky přes řídký papírový filtr smočený *acetonem R*. Kádinka a filtr se promyjí *acetonem R* a filtrát a promývací tekutina se spojí, zředí se *acetonem R* na 100,0 ml a směs se nechá stát bez třepání 24 h. Supernatantní tekutina se použije jako zkoušený roztok.

Porovnávací roztok. Ve 100ml odměrné baňce se rozpustí 0,100 g *kyseliny glykolové R* předem vysušené ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Roztok je stálý 30 dní. Do odměrných baněk se odměří 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml a 2,0 ml tohoto roztoku, zředí se obsah každé baňky *vodou R* na 5,0 ml, přidá se 5 ml *kyseliny octové ledové R* a obsah baněk se zředí *acetonem R* na 100,0 ml.

Do dvou 25ml odměrných baněk se odměří odděleně 2,0 ml zkoušeného roztoku a 2,0 ml porovnávacího roztoku a otevřené baňky se zahřívají ve vodní lázni do odpaření *acetonu R*. Po ochlazení se přidá do každé baňky 5,0 ml *2,7-dihydroxynaftalenu RS*, promíchá se a přidá se dalších 15,0 ml *2,7-dihydroxynaftalenu RS* a znovu se promíchá. Pak se baňky uzavřou hliníkovou fólií a zahřívají se 20 min ve vodní lázni. Po ochlazení se obsah baněk zředí *kyselinou sírovou R* na 25,0 ml.

Měří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm. Připraví se kontrolní roztok za použití 2,0 ml roztoku obsahujícího 5 % (*V/V*) *kyseliny octové ledové R* a 5 % (*V/V*) *vody R* v *acetonu R*. Sestrojí se kalibrační křivka za použití absorbancí porovnávacího roztoku. Z kalibrační křivky a absorbance zkoušeného roztoku se zjistí hmotnost (a) kyseliny glykolové ve zkoušené látce v miligramech a množství glykolanu sodného se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{10 \,.\, 1{,}29 \,.\, a}{(100 - b)m},$$

v němž značí:

1,29 - faktor pro přepočet kyseliny glykolové na glykolan sodný,

b - ztrátu sušením v procentech,

m - navážku zkoušené látky v gramech.

Látky rozpustné ve vodě. Nejvýše 10,0 %. 10,00 g se disperguje v 800,0 ml *vody R* a prvních 30 min se každých 10 min míchá 1 min. Pak se nechá stát 1 h a v případě potřeby se centrifuguje. 200,0 ml tekutiny nad usazeninou se zfiltruje za použití vakua přes řídký filtrační papír. 150 ml získaného filtrátu se odpaří do sucha a suší se 4 h při 100 °C až 105 °C.

Těžké kovy *(2.4.8)*. Ke zbytku získanému při zkoušce Síranový popel se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a odpaří se na vodní lázni. Odparek se převede do 20 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. 14,0 % až 28,0 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 1,00 g za použití směsi stejných objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R*. Rozmezí odpovídá 5,0 % až 9,0 % Na.

Sedimentační objem. Do 100ml odměrného válce se odměří 75 ml *vody R* a přidá se po 0,5g částech celkem 1,5 g zkoušené látky. Po každém přidání se silně protřepe. Směs se zředí *vodou R* na 100,0 ml a opět se třepe, pokud látka není homogenně rozptýlena. Pak se nechá 4 h stát. Objem usazené látky je 10,0 ml až 30,0 ml.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Carvi etheroleum

N

Kmínová silice

Synonyma. Carvi aetheroleum, Oleum carvi

$C_{10}H_{14}O$ M_r 150,22

Je to silice získaná ze zralých plodů druhu *Carum carvi* L. destilací s vodní parou. Obsahuje nejméně 50,0 % karvonu.

Vlastnosti

Bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu a chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, s etherem a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *ethylacetatu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *karvonu R* se rozpustí v *ethylacetatu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,904 až 0,917.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,484 až 1,488.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +70° až +81°.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; 5,0 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Nejvýše 0,150 g.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 0,100 g *kafru R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 1,0 ml se smíchá s 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 50,0 mg *karvonu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 1,0 ml se smíchá s 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony délky 60 m, vnitřního průměru 0,53 mm, se stěnou pokrytou vázanou fází *poly[fenyl(5)methyl(95)]siloxanu R;* tloušťka vrstvy 1,5 μm,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 10 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,

Teplota kolony se zvyšuje ze 60 °C rychlostí 3 °C/min až na 180 °C, při níž se udržuje 5 min; teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 220 °C.

Vstříkne se odděleně po 0,5 μl zkoušeného a porovnávacího roztoku. Opakuje se nejméně třikrát. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: limonenu asi 15,5 min, kafru asi 21 min a karvonu asi 26 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže symetrie píku je nejméně 0,8 a nejvýše 1,2, počítáno pro pík karvonu, a je-li rozlišení dvou po sobě následujících píků nejméně 1,5.

Obsah karvonu ($C_{10}H_{14}O$) v procentech se stanoví metodou vnitřního standardu.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Carvi fructus

Kmínový plod

Synonymum. Fructus carvi

Je to celá usušená nažka druhu *Carum carvi* L. Obsahuje nejméně 30 ml silice v 1 kilogramu drogy, počítáno na sušinu.

Vlastnosti

Droga má charakteristický pach po karvonu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Plod je téměř válcovitá dvojnažka, většinou 3 mm až 6,5 mm dlouhá a 1 mm až 1,5 mm široká. Nažky jsou obvykle jednotlivé, šedohnědé až hnědé, lysé, většinou srpovitého tvaru, na obou koncích zašpičatělé, každá s pěti vyniklými úzkými žebry. Pod lupou na příčném řezu mají tvar téměř pravidelného pětiúhelníku, na hřbetní straně se čtyřmi, na poutcové straně se dvěma siličnými kanálky.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky siličných kanálků, tvořené žlutohnědými až hnědými tenkostěnnými, mnohohrannými sekrečními buňkami, které jsou provázeny vrstvou tenkostěnných příčně protáhlých buněk 8 μm až 12 μm širokých; úlomky oplodí s tenkostěnnými buňkami a někdy s anomocytickými průduchy *(2.8.3)*; četné úlomky endospermu obsahující aleuronová zrna, kapky mastného oleje a mikrokrystaly šťavelanu vápenatého uspořádané v růžici; šroubovitě ztlustlé cévy provázené sklerenchymatickými vlákny; zřídka mohou být přítomny svazky vláken karpoforu; skupiny pravoúhlých až obdélníkovitých sklereid mezokarpu s mírně ztlustlými a tečkovanými stěnami.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (710) se protřepává 2 min až 3 min s 5,0 ml *ethylacetatu R* a zfiltruje se přes *síran sodný bezvodý R*. Filtrát se použije jako zkoušený roztok. *Porovnávací roztok*. 2 μl *karvonu R* a 5 μl *olivového oleje R* se rozpustí v 1,0 ml *ethylacetatu R*.

Na vrstvu se nanese do pruhů 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Ve střední části chromatogramu zkoušeného i porovnávacího roztoku je patrna skvrna karvonu. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 2 min až 4 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Skvrny odpovídající karvonu jsou intenzivně oranžově hnědé. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je nad skvrnou karvonu fialová skvrna (triacylglyceroly) odpovídající polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (triacylglyceroly olivového oleje). Na čele chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna slabě fialová skvrna (terpenické uhlovodíky), v dolní části chromatogramu jsou další slabě fialově šedé nebo nahnědlé skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Voda, stanovení destilací *(2.2.13)*. Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 10,0 g práškované drogy.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 7,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 10,0 g drogy (710) upráškované bezprostředně před použitím se destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v baňce na 500 ml s 200 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Caryophylli etheroleum

Hřebíčková silice

Synonyma. Caryophylli aetheroleum, Oleum caryophylli, Caryophylli floris aetheroleum

Je to silice získaná z usušených poupat druhu *Syzygium aromaticum* (L.) MERILL et L.M.PERRY (*Eugenia caryophyllus* C.SPRING. BULL. et HARR.) destilací s vodní parou.

Vlastnosti

Čirá žlutá kapalina, na vzduchu hnědnoucí. Je mísitelná s dichlormethanem, s etherem, s toluenem a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 20 μl se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R.*
Porovnávací roztok. 15 μl *eugenolu R* a 15 μl *acetyleugenolu R* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 20 μl zkoušeného roztoku a 15 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se v nenasycené komoře *toluenem R* po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min na vzduchu a pak se vyvíjí ještě jednou za stejných podmínek. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrny zhášející fluorescenci se označí. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Skvrny eugenolu na chromatogramu zkoušeného i porovnávacího roztoku jsou intenzivně hnědofialové, skvrny acetyleugenolu slabě fialově modré. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další skvrny; zejména slabě červená skvrna v dolní části chromatogramu a červenofialová skvrna (β-karyofylen) v horní části chromatogramu.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil, viz Zkoušky na čistotu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku retenční časy tří hlavních píků odpovídají retenčním časům tří hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,030 až 1,063.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,528 až 1,537.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. 0° až -2°.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. 1,0 ml zkoušené látky je dobře rozpustný ve 2,0 ml nebo větším objemu *lihu R* 70% *(V/V)*.

Chromatografický profil. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 0,2 g zkoušené látky se rozpustí v 10 g *hexanu R*.

Porovnávací roztok. 7 mg *β-karyofylenu R,* 80 mg *eugenolu R* a 4 mg *acetyleugenolu R* se rozpustí v 10 g *hexanu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- křemenné kapilární kolony délky 60 m, vnitřního průměru 0,25 mm a stěnou pokrytou vázanou fází *makrogolu 20 000 R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1,5 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- dělicího poměru 1/100,

Teplota kolony se udržuje po dobu 8 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 3 °C/min až na 180 °C, při níž se udržuje 5 min, teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 270 °C.

Vstříkne se asi 1,0 μl porovnávacího roztoku. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže počet teoretických pater je nejméně 30 000, počítáno pro pík β-karyofylenu při 110 °C, a je-li rozlišení píků eugenolu a acetyleugenolu nejméně 1,5. Vstříkne se asi 1,0 μl zkoušeného roztoku. Porovnáním retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky přítomné ve zkoušeném roztoku (nepřihlíží se k píku odpovídajícímu hexanu).

Obsah každé ze tří látek v procentech se stanoví metodou absolutní kalibrace.

Obsah látek v procentech se pohybuje v rozmezí: β-karyofylen 5,0 % až 14,0 %, eugenol 75,0 % až 88,0 %, acetyleugenol 4,0 % až 15,0 %.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem a teplem.

Vzor chromatogramu je uveden pro informaci a jako návod při aplikaci analytické metody. Netvoří součást požadavků článku.

Caryophylli flos

Hřebíčkovcový květ

Je to celé poupě druhu *Syzygium aromaticum* (L.) MERR. et L.M.PERRY (*Eugenia caryophyllus* (C.SPRENG.) BULL. et HARR.) sušené tak dlouho, dokud nezíská červenohnědou barvu. Obsahuje nejméně 150 ml silice v 1 kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga má charakteristický aromatický pach.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Poupě je červenohnědé a skládá se z čtyřhranné stopkaté části, hypanthia, dlouhé 10 mm až 12 mm, o průměru 2 mm až 3 mm, zakončené čtyřmi odstávajícími kališními ušty, které obklopují kulovitou hlavičku o průměru 4 mm až 6 mm. Dvoupouzdrý semeník, který obsahuje četná vajíčka, je uložen v horní části hypanthia. Hlavička je kulovitá nebo kupolovitá, je tvořena čtyřmi překrývajícími se lístky korunními, které uzavírají četné dovnitř skloněné tyčinky a krátkou vzpřímenou čnělku, na bázi s terčovitým nektariem.

Stiskne-li se hypanthium mezi nehty, uvolňuje se silice.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je tmavě hnědý, chuť i pach jsou stejné jako u nerozdrobněné drogy. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky hypanthia s pokožkou a pod ní ležícími vrstvami parenchymu s velkými siličnými nádržkami; krátká vlákna, vyskytující se buď jednotlivě, nebo v malých skupinách, se ztlustlými zdřevnatělými, řídce tečkovanými stěnami; mohutný parenchym s drúzami šťavelanu vápenatého; četná trojhranná pylová zrna o průměru asi 15 μm, se třemi klíčními póry v rozích. Škrobová zrna chybí.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,1 g práškované drogy (500) se protřepává 15 min se 2 ml *dichlormethanu R*. Zfiltruje se, filtrát se odpaří opatrně na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 20 μl *eugenolu R* se rozpustí ve 2 ml *toluenu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 10 μl porovnávacího roztoku a 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se v nenasycené komoře *toluenem R* po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min volně na vzduchu a vyvíjí se ještě jednou za stejných podmínek. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm, skvrny se označí. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části patrna skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku, pod skvrnou eugenolu může být další, méně intenzivní skvrna (acetyleugenol). Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C, pozoruje se v denním světle. Skvrny odpovídající eugenolu na chromatogramech zkoušeného roztoku i porovnávacího roztoku jsou intenzivně hnědofialové, skvrna odpovídající acetyleugenolu na chromatogramu zkoušeného roztoku je slabě fialovomodře zbarvena. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrny další skvrny, v dolní části chromatogramu slabě červená, v horní části červenofialová (karyofylen).

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*):
- nejvýše 4 % rozkvetlých poupat, květních stopek a plodů,
- nejvýše 2 % znehodnocené drogy,
- nejvýše 0,5 % ostatních cizích příměsí.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 7,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 5,0 g drogy se rozetře s 5,0 g *křemeliny R* na jemný homogenní prášek. 4,0 g této směsi se ihned použije k vlastnímu stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2,5 ml/min až 3,5 ml/min v 250ml baňce se 100 ml *vody R* jako destilační tekutiny; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

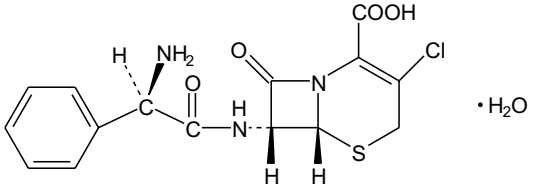
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Cefaclorum

1998

Cefaklor



$C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$. H_2O M_r 385,82 CAS 70356-03-5

M_r bezvodého 367,81

Je to monohydrát kyseliny (6*R*,7*R*)-7-[(*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3-chlor-8-oxo-5-thia-1--azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v dichlormethanu a methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *cefakloru CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného HF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *cefakloru CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *cefakloru CRL* a 10 mg *cefalexinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *roztoku octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo předem upraveno na 6,2 *kyselinou octovou R*, (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS* a obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká žlutohnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 4,5; měří se suspenze 0,250 g zkoušené látky v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +101° až +111°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v 10,0 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (2,7 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 2,5.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *cefakloru CRL* a 5,0 mg *delta-3-cefakloru CRL* se rozpustí ve 100,0 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (2,7 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 2,5.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí na 100,0 ml roztokem *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (2,7 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 2,5.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem dodatečně oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- následujících mobilních fází s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (7,8 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 4,0,
  - *mobilní fáze B* - 450 ml *acetonitrilu R* se smíchá s 550 ml mobilní fáze A,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Nejméně 15 min před každým rozborem se kolona ustaluje promýváním směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (5 + 95). Nastříknou se roztoky a nastaví se gradient eluce tak, že se 30 min lineárně zvyšuje koncentrace mobilní fáze B o 0,67 % (*V/V*) za minutu (25 % *V/V*). Potom se 15 min lineárně zvyšuje koncentrace mobilní fáze B o 5 % (*V/V*) za minutu (100 % *V/V*). Nakonec se kolona 10 min vymývá mobilní fází B a do znovu ustálení kolony se pak vymývá směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (5 + 95).

Nastříkne se porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu rozlišení mezi píky cefakloru a delta-3-cefakloru je nejméně 2 a je-li faktor symetrie píku cefakloru nejvýše 1,2. Pokud je nutno, upraví se obsah acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztok (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku mobilní fáze, větší než 0,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2 %). Nepřihlíží se k žádnému píku s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 3 ml základního *roztoku olova R (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 6,5 %; provede se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 15,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15,0 mg *cefakloru CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 15,0 mg *cefakloru CRL* a 15,0 mg *delta-3-cefakloru CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

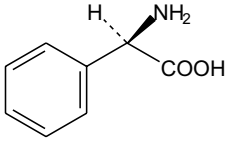
Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je směsí připravenou přidáním 220 ml *methanolu R* ke směsi 780 ml *vody R*, 10 ml *triethylaminu R* a 1 g *pentansulfonanu sodného R*, jejíž pH bylo upraveno na 2,5 *kyselinou fosforečnou R*,
- spektrofotometrického detektoru, 265 nm,
- injektorové smyčky 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem cefakloru a píkem delta-3-cefakloru je nejméně 2,5 a je-li faktor symetrie píku cefakloru nejvýše 1,5. Podle potřeby se upraví koncentrace methanolu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefakloru je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

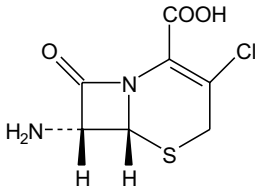
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

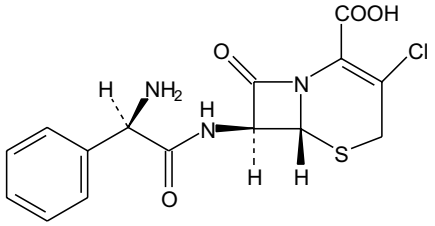
Nečistoty



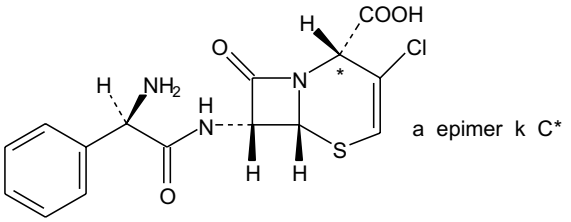
A. kyselina (2*R*)-2-amino-2-fenyloctová (fenylglycin),



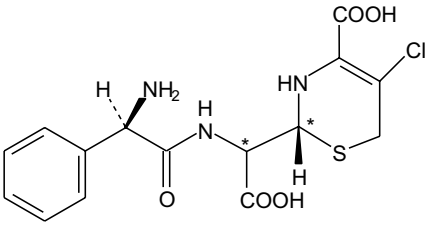
B. kyselina (6*R*,7*R*)-7-amino-3-chlor-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-karboxylová,



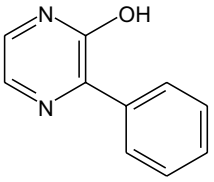
C. kyselina (6*R*,7*S*)-7-{[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetyl]amino}-3-chlor-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo-[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,



D. kyseliny (2*R*,6*R*,7*R*)-a (2*S*,6*R*,7*R*)-7-{[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetyl]amino}-3-chlor-8-oxo -5-thia- -1-azabicyklo[4,2,0]okt-3-en-2-karboxylová (delta-3-cefaklor),



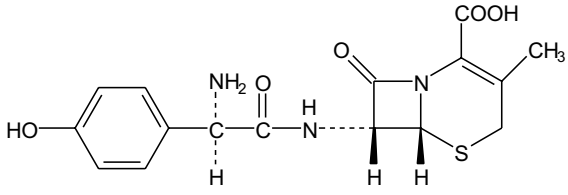
E. kyselina {[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetyl]amino]karboxymethyl}-3,6-dihydro-5-chlor-2*H*-1,3-thiazin-4-karboxylová,



F. 3-fenylpyrazin-2-ol.

† Cefadroxilum

Cefadroxil



$C_{16}H_{17}N_3O_5S$ M_r 363,39 CAS 50370-12-2

Je to kyselina (6*R*,7*R*)-7-[(*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3-methyl-8-oxo-5-thia--1-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{17}N_3O_5S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *cefadroxilu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití *silikagelu HF$_{254}$ silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *cefadroxilu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *cefadroxilu CRL* a 20 mg *cefalexinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 6,2 *kyselinou octovou R*, (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se dají do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá otáčením; roztok je žlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká oranžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 6,0; měří se suspenze 1,0 g zkoušené látky ve 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +165° až +178°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 50,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 20,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 6,0* a zředí se jím na 100,0 ml. Absorbance měřená při 330 nm není vyšší než 0,05. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí na 100,0 ml *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 6,0*. Měří se absorbance tohoto roztoku při 235 nm až 340 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 264 nm. Specifická absorbance v maximu je 225 až 250, počítáno na bezvodou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, *vody R* a *lihu 96% R* (3 + 22 + 75) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, *vody R* a *lihu 96% R* (3 + 22 + 75) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *kyseliny 7-aminodeacetoxycefalosporanové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, *vody R* a *lihu 96% R* (3 + 22 + 75) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *D-α-(4-hydroxy-fenyl)glycinu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, *vody R* a *lihu 96% R* (3 + 22 + 75) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). K 1,0 ml zkoušeného roztoku se přidá 0,5 ml porovnávacího roztoku (b) a 0,5 ml porovnávacího roztoku (c).

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) a 4 µl porovnávacího roztoku (d). Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *lihu 96% R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (4 + 20 + 20 + 56) po dráze 10 cm. Vrstva se 10 min zahřívá při 105 °C až 110 °C a postříká se *ninhydrinem RS2*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající polohou skvrně kyseliny 7-aminodeacetoxycefalosporanové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %), žádná skvrna odpovídající skvrně D-α-(4-hydroxyfenyl)glycinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %), žádná skvrna kromě hlavní skvrny a skvrn výše zmíněných není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá

5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 4,0 % až 6,0 %, stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *cefadroxilu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *cefadroxilu CRL* a 50 mg *amoxicilinu trihydrátu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm nebo 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (2,72 g/l) (4 + 96), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky 20 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost tak, aby výška píků odpovídala nejméně polovině rozsahu stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky cefadroxilu a amoxicilinu je nejméně 5,0. Podle potřeby se nastaví obsah acetonitrilu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se vstříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku cefadroxilu nejvýše 1,0 %. Vstřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztok (a). Obsah cefadroxilu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

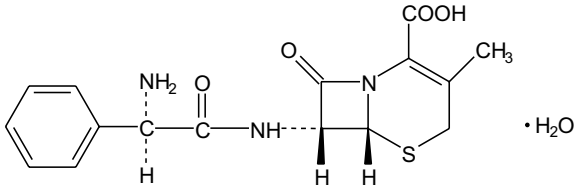
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.

Separandum.

† Cefalexinum monohydricum

Monohydrát cefalexinu

Synonymum. Cefalexinum



$C_{16}H_{17}N_3O_4S$. H_2O M_r 365,40 CAS 23325-78-2

Je to monohydrát kyseliny (6*R*, 7*R*)-7-[(*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3-methyl-8-oxo-5-thia-1--azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{17}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je rozpustný v asi 100 dílech vody, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *cefalexinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (a). 20 mg *cefalexinu CRL* se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (b). 20 mg *cefalexinu CRL* a 20 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou R* na 6,2, (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je světle žlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.4*). 4,0 až 5,5. Měří se následující roztok: 50 mg se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +149° až +158°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,125 g v *tlumivém roztoku hydrogenftalanovém o pH 4,4* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Absorbance měřená při 330 nm není vyšší než 0,05. 2,0 ml roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance při 220 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 262 nm. Specifický absorpční koeficient v maximu je 220 až 245, počítáno na bezvodou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*. Vrstva se impregnuje tak, že se vyvíjí směsí objemových dílů *tetradekanu R* a *hexanu R* (5 + 95). Po odpaření směsi se ve stejném směru provede chromatografie.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *kyseliny 7-aminodeacetoxycefalosporanové CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml (*porovnávací roztok b'*). 1 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *α-fenylglycinu R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml (*porovnávací roztok c'*). 1 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,25 g zkoušené látky se rozpustí ve směsi 1 ml porovnávacího roztoku b' a 1 ml porovnávacího roztoku c' a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (72 g/l) a roztoku *kyseliny citronové R* (21 g/l) (3 + 80 + 120) po dráze 15 cm. Vrstva se 3 min zahřívá při 90 °C a ještě za horka se postříká roztokem *ninhydrinu R* (1 g/l) v mobilní fázi. Vrstva se zahřívá 15 min při 90 °C a nechá se vychladnout. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající kyselině 7-aminodeacetoxycefalosporanové není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); žádná skvrna odpovídající α-fenylglycinu (jejíž poloha se určí srovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (d)) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících kyselině 7-aminodeacetoxycefalosporanové a α-fenylglycinu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 4,0 % až 8,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *cefalexinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *cefalexinu CRL* a 10 mg *cefradinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm nebo 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R*, *acetonitrilu R*, roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (13,6 g/l) a *vody R* (2 + 5 + 10 + 83); průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost tak, aby výška píků odpovídala nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky cefalexinu a cefradinu je nejméně 4. Podle potřeby se upraví obsah acetonitrilu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se vstříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefalexinu je nejvýše 1 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikují střídavě. Obsah cefalexinu se vypočítá v procentech.

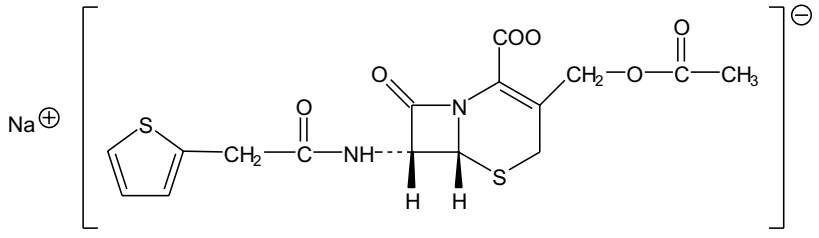
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

† Cefalotinum natricum

1998

Sodná sůl cefalotinu



$C_{16}H_{15}N_2NaO_6S_2$ M_r 418,41 CAS 58-71-9

Je to sodná sůl kyseliny (6*R*,7*R*)-3-acetoxymethyl-8-oxo-7-[2-(2-thienyl)acetamido]-5-thia--1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{15}N_2NaO_6S_2$.

Výroba

Pokud se vyrábí způsobem, který může v látce zanechat zbytky kyseliny 2-ethylhexanové, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,5 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek snadno rozpustný ve vodě. Je těžce rozpustná v ethanolu, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli cefalotinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 20 mg zkoušené látky se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli cefalotinu CRL* se rozpustí v 5 ml stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (b). 20 mg *sodné soli cefalotinu CRL* a 20 mg *cefaloridinu (alfa-forma nebo delta-forma) CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonitrilu R*, a *roztoku octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 6,2 *kyselinou octovou R*, (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje svou polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je hnědočervený. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zabarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) roztoku S měřená při 450 nm není vyšší než 0,20.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 7,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.27*). +124° až +134°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztok (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající čtyřnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než trojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.24*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,13 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg zkoušené látky se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *sodné soli cefalotinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se 10 min zahřívá ve vodní lázni při 90 °C. Ochladí se a ihned se vstřikuje.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min připravenou takto: 17 g *octanu sodného R* se rozpustí v 790 ml *vody R*, přidá se 0,6 ml *kyseliny octové ledové R*, a pokud je to třeba, upraví se pH na 5,8 až 6,0 *hydroxidem sodným zředěným RS* nebo *kyselinou octovou ledovou R*, přidá se 150 ml *acetonitrilu R* a 70 ml *ethanolu R* a promíchá se,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 10 µl.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C. Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost zapisovače tak, aby výška píků odpovídala nejméně polovině celé stupnice zapisovače. Na získaném chromatogramu jsou dva hlavní píky odpovídající cefalotinu a desacetylcefalotinu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi těmito píky není menší než 9,0. Podle potřeby se přizpůsobí obsah acetonitrilu v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, je-li faktor symetrie píku cefalotinu nejvýše 1,8. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku cefalotinu nejvýše 1,0 %. V případě potřeby se nastaví parametry integrátoru. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztok (a). Vypočítá se obsah sodné soli cefalotinu v procentech.

Uchovávání

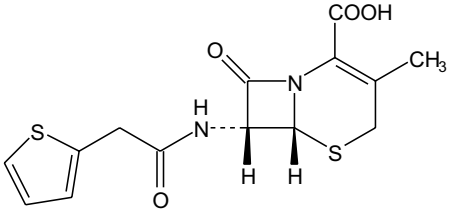
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

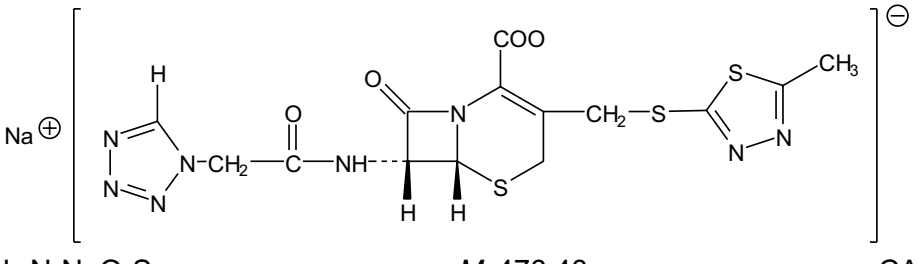
Nečistoty



A. kyselina (6*R*,7*R*)-3-methyl-8-oxo-7-{[2-(2-thienyl)acetyl]-amino}-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]-okt-2-en-2-karboxylová (deacetoxycefalotin).

† Cefazolinum natricum

Sodná sůl cefazolinu



$C_{14}H_{13}N_8NaO_4S_3$ M_r 476,48 CAS 27164-46-1

Je to sodná sůl kyseliny (6*R*,7*R*)-3-[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl]-8-oxo-7-[2-(1*H*-tetrazol-1-yl)acetamido]-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{13}N_8NaO_4S_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek, velmi hygroskopický. Je snadno rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF$_{254}$ silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli cefazolinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (b). 20 mg *sodné soli cefazolinu CRL* a 20 mg *sodné soli cefoxitinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo předem upraveno *kyselinou octovou ledovou R* na hodnotu 6,2, (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS.* Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem, roztok je hnědočervený. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně, vzniká žluté zbarvení.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) roztoku S měřená při 430 nm není větší než 0,15.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 6,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -15° až -24°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydrogenuhličitanem sodným RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 272 nm. Specifická absorbance v maximu je 260 až 300, počítáno na bezvodou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese v proudu dusíku odděleně po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 20 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm, pak se vystaví působení jodových par v těsnící nádobě, dokud se neobjeví skvrny. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g; provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g se ve zkumavce se zábrusem přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře zátkou a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se ve zkumavce se zábrusem přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře zátkou a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 6,0 %; stanoví s 0,300 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,15 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *sodné soli cefazolinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 mg *sodné soli cefuroximu CRL* se rozpustí v 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a směsi obsahující roztok *hydrogenfosforečnanu sodného R* (2,77 g/l) a roztok *kyseliny citronové R* (1,86 g/l) (10 + 90); průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 270 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost tak, aby výška píků odpovídala nejméně polovině rozsahu celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky cefazolinu a cefuroximu je nejméně 2,0. Podle potřeby se přizpůsobí obsah acetonitrilu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefazolinu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikují střídavě.

Obsah sodné soli cefazolinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

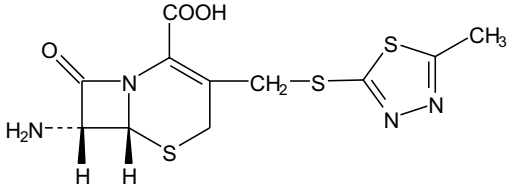
Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

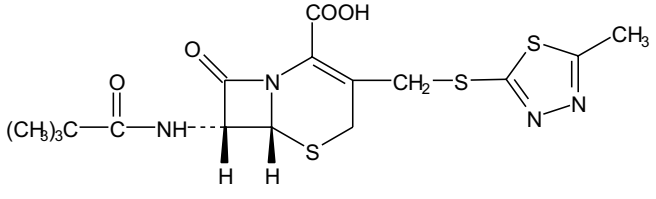
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

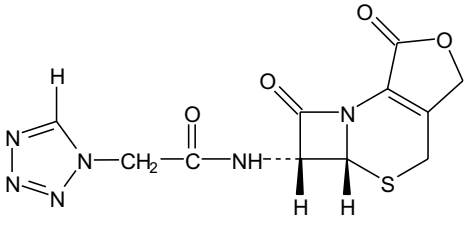
Nečistoty



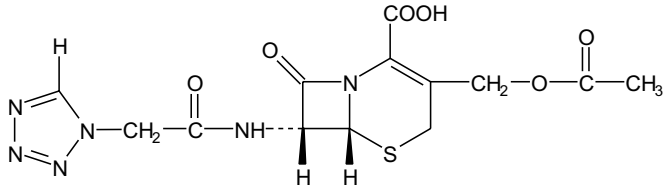
A. kyselina (6*R*,7*R*)-7-amino-3-[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,



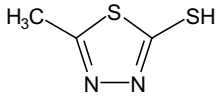
B. kyselina (6*R*,7*R*)-3-[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl]-8-oxo-7-pivaloylamino-5-thia-1--azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,



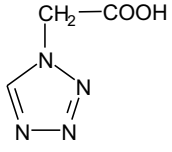
C. lakton kyseliny (6*R*,7*R*)-3-hydroxymethyl-8-oxo-7-[2-(1*H*-tetrazol-1-yl)acetamido]-5-thia-1-aza-bicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylové,



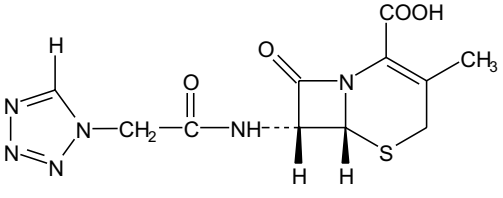
D. kyselina (6*R*,7*R*)-3-acetoxymethyl-8-oxo-7-[2-(1*H*-tetrazol-1-yl)acetamido]-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,



E. 5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-thiol,



F. kyselina 2-(1*H*-tetrazol-1-yl)octová,

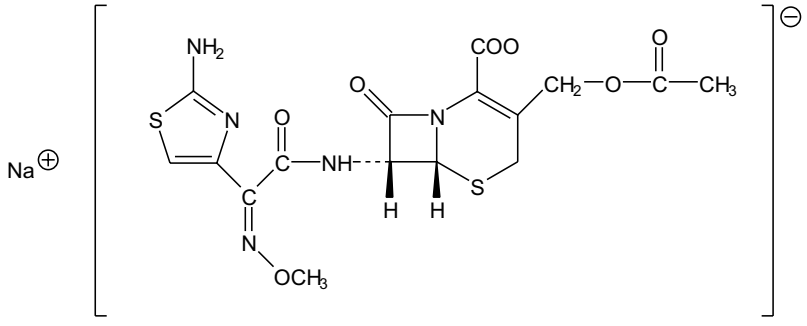


G. kyselina (6*R*,7*R*)-3-methyl-8-oxo-7-[2-(1*H*-tetrazol-1-yl)acetamido]-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová.

† Cefotaximum natricum

1998

Sodná sůl cefotaximu



$C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$ M_r 477,44 CAS 64485-93-4

Je to sodná sůl kyseliny (*Z*)-(6*R*,7*R*)-3-acetoxymethyl-7-[2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-(methoxyiminoacetamido]-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$.

Výroba

Pokud se vyrábí způsobem, který může v látce zanechat zbytky kyseliny 2-ethylhexanové, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,5 %, stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v methanolu, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli cefotaximu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného HF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 20 mg zkoušené látky se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli cefotaximu CRL* se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*

Porovnávací roztok (b). 20 mg *sodné soli cefotaximu CRL* a 20 mg *sodné soli cefoxitinu CRL* se rozpustí v 5,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l).*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl ze všech roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo dříve upraveno *kyselinou octovou R* na hodnotu 6,2 (15 + 85), po dráze 15 cm. Vrstva se nechá uschnout a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS* a obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká hnědé zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny octové ledové R.* Roztok hodnocený ihned je čirý. Absorbance (*2.2.25*) roztoku S měřená při 430 nm není větší než 0,20.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +58° až +64°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený takto: 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 20,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Specifická absorbance v maximu při 235 nm je 360 až 390, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve stati Stanovení obsahu.

Nastřikuje se zkoušený roztok a porovnávací roztok (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající osminásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než trojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3 %).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky se ve zkumavce se zábrusem přidá 5 ml *hydroxidu sodného (1 mol/l) RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se ve zkumavce se zábrusem přidá 5 ml

hydroxidu sodného (1 mol/l) RS a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře zátkou a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii silanizovanou R*, napojenou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 3,0 %; 1,000 g se zahřívá v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.24*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,05 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *sodné soli cefotaximu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). K 4,0 ml zkoušeného roztoku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Roztok se 2 h zahřívá na 40 °C, přidá se 5,0 ml *tlumivého roztoku o pH 6,6* a 1,0 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, kterou je směs připravená takto: 3,5 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 11,6 g *hydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R* (pH 7,0) a přidá se 180 ml *methanolu R*,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm,
- pevné injektorové smyčky, 10 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (a) a porovnávací roztok (c). Nastaví se citlivost tak, aby se získaly hlavní píky porovnávacího roztoku (c) o výšce nejméně poloviny celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže je cefotaxim eluován jako druhý z hlavních píků a rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 3,5. V případě potřeby se použije jiná stacionární fáze nebo se upraví obsah methanolu v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, jestliže faktor symetrie píku cefotaximu je menší než 2,0. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefotaximu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok se vstřikují střídavě.

Uchovávání

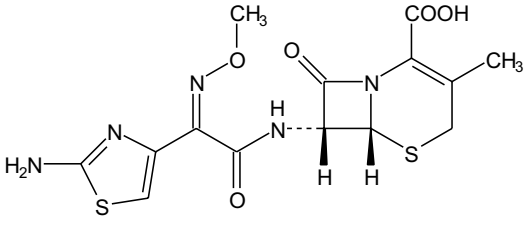
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Jestliže je látka sterilní, obal je sterilní vzduchotěsný a zabezpečený.

Separandum.

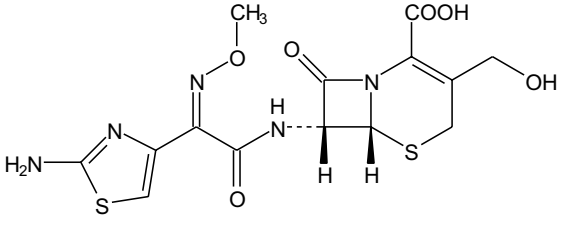
Označování

V označení se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prosta bakteriálních endotoxinů.

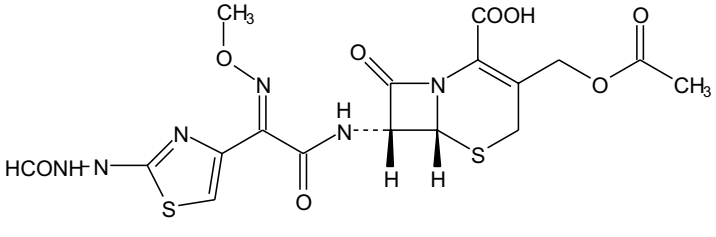
Nečistoty



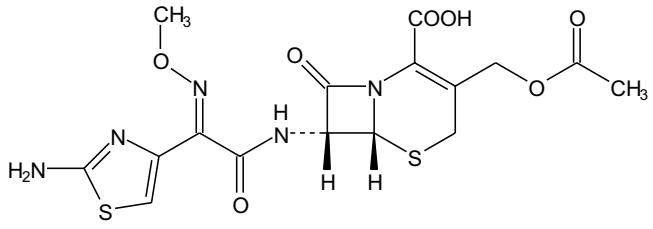
A. kyselina (6*R*,7*R*)-7-[(*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-methyl-8-oxo--5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová (deacetoxycefotaxim),



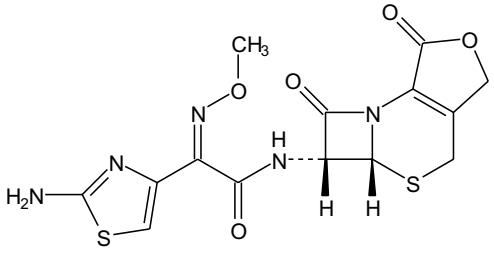
B. kyselina(6*R*,7*R*)-7-[(*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-hydroxymethyl-8--oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová (deacetylcefotaxim),



C. kyselina (6*R*,7*R*)-3-acetyloxymethyl-7-{(*Z*)-2-[2-(formylamino)thiazol-4-yl]-2-methoxyimino-acetamido}-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová (N-formylcefotaxim),



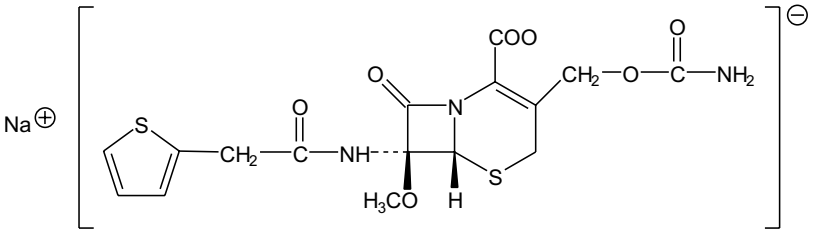
D. kyselina (6*R*,7*R*)-3-acetyloxymethyl-7-[(*E*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová (*E*-cefotaxim),



E. (*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-N-[5a*R*,G*R*)-1,4,6,7-tetrahydro-1,7-dioxo-3*H*,5a*H*-azeto[2,1-*b*]-furo[3,4-*d*][1,3]thiazin-6-yl-2(methoxyimino)acetamid (deacetylcefotaximlakton).

† Cefoxitinum natricum

Sodná sůl cefoxitinu



$C_{16}H_{16}N_3NaO_7S_2$ M_r 449,43 CAS 33564-30-6

Je to sodná sůl kyseliny (6*R*,7*S*)-3-karbamoyloxymethyl-7-methoxy-8-oxo-7-[2-(2-thienyl)acetamido]-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{16}N_3NaO_7S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek, velmi hygroskopický. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli cefoxitinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli cefoxitinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *sodné soli cefoxitinu CRL* a 20 mg *sodné soli cefazolinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí směsí objemových dílů *tetrahydrofuranu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo předem upraveno na 6,2 *kyselinou octovou RS*, (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je světlehnědý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než nejpodobnější porovnávací barevný roztok intenzity 5 (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,2 až 7,0; měří se roztok připravený zředěním 2 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +206° až +214°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *methanolu R* a zředěním *methanolem R* na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydrogenuhličitanem sodným RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 236 nm a široké absorpční maximum při 262 nm; specifická absorbance v širokém maximu je 190 až 210, počítáno na bezvodou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 20 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,13 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *sodné soli cefoxitinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *kyseliny (2-(2-thienyl)octové) R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 5,0 ml porovnávacího roztoku (b).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 19 + 81),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků odpovídala nejméně polovině celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 3,5. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefoxitinu je nejméně 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikují střídavě.

Obsah sodné soli cefoxitinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

A. bis(dicyklohexylamoniová) sůl kyseliny 3-karbamoyloxymethyl-7-(5-karbamoyl-5-tosyl-amino--pentanamido)-7-methoxy-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylové,

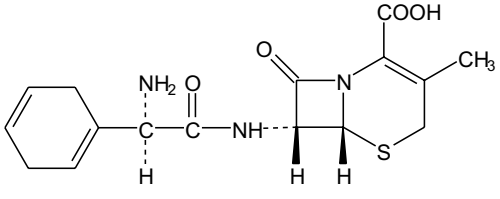
B. kyselina(6*R*,7*S*)-7-methoxy-3-methoxykarbonylaminomethylkarbamoyloxymethyl-8-oxo-7-[2-(2--thienyl)acetamido]-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,

C. kyselina(6*R*,7*S*)-3-karbamoyloxymethyl-7-methoxy-8-oxo-7-[2-(2-thienyl)acetamido]-5-thia-1--azabicyklo[4,2,0]okt-3-en-2-karboxylová,

D. kyselina 2-(2-thienyl)octová.

† Cefradinum

Cefradin



$C_{16}H_{19}N_3O_4S$ M_r 349,40 CAS 38821-53-3

Je to kyselina (6*R*,7*R*)-7-[(*R*)-2-amino-2-(cyklohexa-1,4-dienyl)acetamido]-3-methyl-8-oxo-5--thia-1-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje nejméně 90,0 % sloučeniny $C_{16}H_{19}N_3O_4S$. Součet obsahu $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ a cefalexinu ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$; M_r 347,39) je 95,0 % až 102,0 %, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý hygroskopický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v etheru a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *cefradinu CRL*. Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně 30 mg zkoušené látky a

30 mg referenční látky v 10 ml *methanolu R*, odpaří se do sucha při 40 °C při tlaku menším než 2 kPa a se získanými zbytky se zaznamenají nová spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *cefradinu CRL* a 20 mg *cefalexinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož hodnota pH byla upravena na 6,2 *kyselinou octovou ledovou R*, (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se svou polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je světle žlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí v *uhličitanu sodném RS* a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*). Roztok S se nechá stát 5 min. Absorbance roztoku S měřená při 450 nm (*2.2.25*) není vyšší než 0,20.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 6,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +80° až +90°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *tlumivém roztoku octanovém o pH 4,6* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Absorbance měřená při 330 nm není vyšší než 0,05. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 220 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 262 nm. Specifická absorbance v maximu je 215 až 240, počítáno na bezvodou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*. Vrstva se impregnuje vyvíjením směsí objemových dílů *tetradekanu R* a *hexanu R* (5 + 95). Po odpaření se ve stejném směru provede chromatografie.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí na 100 ml *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*.

Porovnávací roztok (b). 25 mg *kyseliny 7-aminodeacetoxycefalosporanové CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml *(porovnávací roztok b')*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *cyklohexa-1,4-dienylglycinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml *(porovnávací roztok c')*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,25 g zkoušené látky se rozpustí ve směsi 1 ml porovnávacího roztoku b' a 1 ml porovnávacího roztoku c' a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (72 g/l) a roztoku *kyseliny citronové R* (21 g/l) (3 + 80 + 120) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší zahříváním při 90 °C po dobu 3 min. Horká vrstva se postříká roztokem *ninhydrinu R* (1 g/l) v mobilní fázi. Vrstva se 15 min zahřívá při 90 °C a nechá se ochladit. Na chromatogramu zkoušeného roztoku: žádná skvrna odpovídající kyselině 7-aminodeacetoxycefalosporanové není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); žádná skvrna odpovídající cyklohexa-1,4-dienylglycinu (její poloha se určí porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (d)) není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících kyselině 7-aminodeacetoxycefalosporanové a cyklohexa-1,4--dienylglycinu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Cefalexin. Nejvýše 5,0 %, počítáno na bezvodou látku. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se odděleně zkoušený roztok a porovnávací roztok (b).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstředí a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 6,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *cefradinu CRL* a 10,0 mg *cefalexinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm nebo 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS*, roztoku *octanu sodného R* (36,2 g/l), *methanolu R* a *vody R* (1 + 17 + 200 + 782), s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku odpovídala nejméně polovině rozsahu celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky cefalexinu a cefradinu je nejméně 4. Podle potřeby se upraví koncentrace methanolu v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se vstříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefradinu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikují odděleně.

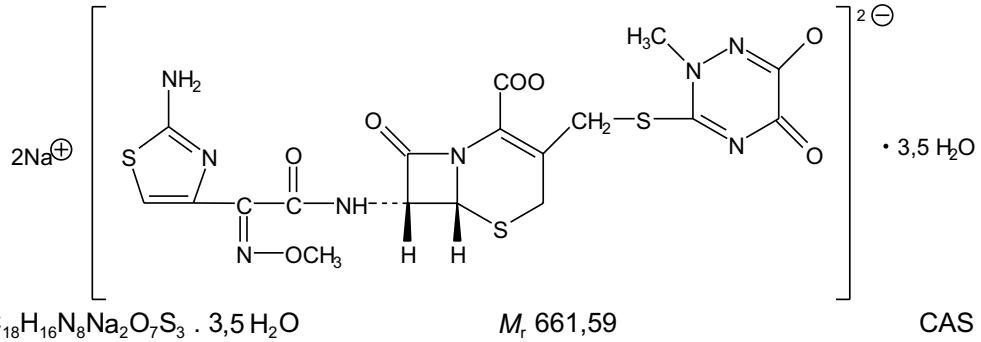
Obsah cefradinu a cefalexinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

† Ceftriaxonum natricum

Sodná sůl ceftriaxonu



$C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3$. 3,5 H_2O M_r 661,59 CAS 104376-79-6

Je to trihemihydrát disodné soli kyseliny (*Z*)-(6*R*,7*R*)-7-[2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo-3-[2,5-dihydro-2-methyl-6-oxido-5-oxo-1,2,4-triazin-3-yl)thiometh]-5-thia-1-

-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3$.

Vlastnosti

Téměř bílý nebo nažloutlý krystalický prášek, slabě hygroskopický. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v methanolu a velmi těžce rozpustná v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli ceftriaxonu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli ceftriaxonu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *sodné soli ceftriaxonu CRL* a 20 mg *cefradinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí *methylacetatu R* a roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož hodnota pH byla upravena *kyselinou octovou R* na 6,2, (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je zelenožlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká žluté zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,40 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ nebo $HŽ_5$ (*2.2.2*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 8,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -155° až -170°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve stati Stanovení obsahu.

Nastřikuje se zkoušený roztok a porovnávací roztok (c). Chromatogram se nechá vyvíjet po dobu odpovídající nejméně dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než čtyřnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (4,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 10 % plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 8,0 % až 11,0 %, stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,20 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 30,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 30,0 mg *sodné soli ceftriaxonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 mg *sodné soli ceftriaxonu CRL* a 5,0 mg *ceftriaxonu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, kterou je směs připravená takto: 2,0 g *tetradecylamoniumbromidu R* a 2,0 g *tetraheptylamoniumbromidu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R*, *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*, tlumivého roztoku citronanového o pH 5,0 (který se připraví rozpuštěním 20,17 g *kyseliny citronové R* v 800 ml *vody R*, upravením hodnoty pH *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na 5,0 a zředěním *vodou R* na 1000,0 ml) a *acetonitrilu R* (440 + 55 + 5,0 + 500),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků odpovídala nejméně polovině celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 3,0. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku sodné soli ceftriaxonu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok se nastřikují střídavě.

Obsah sodné soli ceftriaxonu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečných obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

A. disodná sůl kyseliny (*E*)-(6*R*,7*R*)-7-[(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)(methoxyimino)acetamido]-3-{[(2,5-dihydro-2-methyl-6-oxido-5-oxo-1,2,4-triazin-3-yl)thio]methyl}-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylové) (*E*-izomer),

B. (*Z*)-2-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)-N-[(5*aR*,6*R*)-1,7-dioxo-1,4,6,7-tetrahydro-3*H*,5*aH*-azeto[2,1-*b*]furo[3,4-*d*][1,3]thiazin-6-yl]-2-(methoxyimino)acetamid,

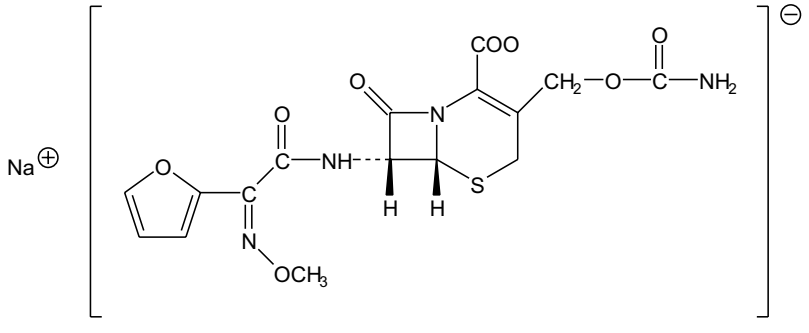
C. 6-hydroxy-2-methyl-3-merkapto-1,2,4-triazin-5(2*H*)-on,

D. S-(1,3-benzothiazol-2-yl)-(*Z*)-(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)(methoxyimino)thioacetat,

E. kyselina (6*R*,7*R*)-7-amino-3-{[(2,5-dihydro-6-hydroxy-2-methyl-5-oxo-1,2,4-triazin-3-yl)thio]methyl}-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová.

† Cefuroximum natricum

Sodná sůl cefuroximu



$C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$ M_r 446,37 CAS 56238-63-2

Je to sodná sůl kyseliny (*Z*)-(6*R*,7*R*)-3-(karbamoyloxymethyl)-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]-2-okten-2-karboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek, slabě hygroskopický. Je snadno rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) se shoduje se spektrem *sodné soli cefuroximu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli cefuroximu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *sodné soli cefuroximu CRL* a 20 mg *sodné soli cefoxitinu CRL* se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *tetrahydrofuranu R* a roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož hodnota pH byla předem upravena *kyselinou octovou R* na 6,2, (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je světle hnědý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) roztoku S měřená při 450 nm je nejvýše 0,25.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 8,5. Měří se roztok připravený zředěním 2 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +59° až +66°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *tlumivém roztoku octanovém o pH 4,6* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu.

Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztoky (b) a (c). Chromatogram se nechá vyvíjet po dobu odpovídající nejméně trojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku deskarbamoylcefuroximu (určená porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (b)) větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího deskarbamoylcefuroximu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu

porovnávacího roztoku (c) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než trojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,5 %; stanoví se s 0,400 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,10 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *sodné soli cefuroximu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 ml porovnávacího roztoku (a) se 10 min zahřívá ve vodní lázni při 60 °C. Ochladí se a ihned nastříkne.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem hexylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a tlumivého roztoku octanového o pH 3,4 (který se připraví rozpuštěním 6,01 g *kyseliny octové ledové R* a 0,68 g *octanu sodného R* ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 1000 ml) (1 + 99),
- spektrofotometrického detektoru, 273 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b); na chromatogramu jsou píky odpovídající cefuroximu a deskarbamoylcefuroximu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi těmito píky je nejméně 2,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku byla nejméně čtvrtina celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže faktor symetrie píku cefuroximu je nejvýše 1,5. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku cefuroximu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Obsah sodné soli cefuroximu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

A. kyselina (*Z*)-(6*R*,7*R*)-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-hydroxymethyl-8-oxo-5-thia--1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,

B. kyselina (*Z*)-(6*R*,7*R*)-3-acetoxymethyl-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo-5-thia--1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová (cefuracetim),

C. kyselina (*Z*)-(6*R*,7*R*)-7-[2-(2-furyl-2-(methoxiimino)acetamido]-3-methyl-8-oxo-5-thia-1--azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,

D. kyselina (*Z*)-(6*R*,7*R*)-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo-3-trichloracetyl--karbamoyloxymethyl-5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,

E. kyselina (*Z*)-(6*R*,7*R*)-3-karbamoyloxymethyl-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo--5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová (cefuroxim),

F. kyselina (*E*)-(6*R*,7*R*)-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-hydroxymethyl-8-oxo-5-thia--1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,

G. kyselina (*E*)-(6*R*,7*R*)-3-acetoxymethyl-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-8-oxo-5-thia--1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylová,

H. lakton kyseliny (*Z*)-(6*R*,7*R*)-7-[2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)acetamido]-3-hydroxymethyl-8-oxo--5-thia-1-azabicyklo[4,2,0]okt-2-en-2-karboxylové,

I. kyselina (*Z*)-2-(2-furyl)-2-(methoxyimino)octová.

Cellacefatum

Celacefat

Synonyma. Cellulosi acetas phthalas, Cellacephatum, Celophthalum

Je to částečně O-acetylovaná a O-ftalylovaná celulosa. Obsahuje 30,0 % až 36,0 % hydrogenftaloylových skupin ($C_8H_5O_3$; relativní hmotnost skupiny 149,13) a 21,5 % až 26,0 % acetylových skupin (C_2H_3O; relativní hmotnost skupiny 43,05), u obou počítáno na bezvodou a kyselin prostou látku.

Vlastnosti

Bílý sypký prášek nebo bezbarvé vločky, hygroskopický. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v diethylenglykolu, prakticky nerozpustný v ethanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. pro celacefat*.

B. 150 mg se rozpustí v 1 ml *acetonu R*. Tento roztok se naleje na skleněnou desku a vysuší se; vznikne tenký průsvitný lesklý film.

Zkoušky na čistotu

Zdánlivá viskozita *(2.2.8)*. 45 mPa.s až 90 mPa.s; měří se roztok při 25 °C připravený rozpuštěním 15 g (počítáno na bezvodou látku) v 85 g směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (1 + 249).

Volné kyseliny. Nejvýše 3,0 % (*S*), počítáno jako kyselina ftalová na bezvodou látku. 3,0 g se třepou 2 h se 100 ml směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (35 + 65) a směs se zfiltruje. Baňka a filtr se promyjí dvakrát 10 ml stejné směsi a promývací tekutina se spojí s filtrátem. Takto připravený roztok se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *fenolftaleinu RS* jako indikátoru do vzniku slabě růžového zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,3 mg volných kyselin, počítáno jako kyselina ftalová.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky. Zkouška se provede v prostředí směsi objemových dílů *dichlormethanu R* a *ethanolu R* (2 + 3).

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Ftaloylové skupiny. 1,000 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *acetonu R* a *lihu 96% R* (2 + 3). Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do slabě růžového zbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah ftaloylových skupin vyjádřený v procentech (*P*) se vypočte podle vzorce:

$$\frac{149n}{(100 - a)m} - 1{,}795S,$$

v němž značí:
a - obsah vody v procentech, viz Zkoušky na čistotu,
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* v mililitrech,
S - obsah volných kyselin v procentech, viz Zkoušky na čistotu.

Acetylové skupiny. K 0,100 g se přidá 25,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do odbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah acetylových skupin vyjádřený v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{43(n_2 - n_1)}{(100 - a)m} - (0{,}578P + 0{,}518S),$$

v němž značí:
a - obsah vody v procentech,
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* v mililitrech,
n_2 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* zjištěnou při slepé zkoušce v mililitrech,
P - obsah ftaloylových skupin v procentech,
S - obsah volných kyselin v procentech (viz Zkoušky na čistotu).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Cellulosi acetas

Acetat celulosy

Je to částečně O-acetylovaná celulosa. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 29,0 % až 42,0 % acetylových skupin (C_2H_3O). Obsah acetylových skupin je 90,0 % až 110,0 % deklarovaného obsahu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý nažloutlý nebo našedlý prášek nebo granule, hygroskopický. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v kyselině mravenčí, v 2-methoxyethanolu a ve směsi stejných objemových dílů methanolu a dichlormethanu, prakticky nerozpustný v acetonu a lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. pro acetat celulosy*.

B. Vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*. Směs se zahřívá pomalu k varu nad otevřeným plamenem.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. K 5,00 g v 250ml kuželové baňce se přidá 150 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, baňka se uzavře, suspenze se opatrně zamíchá, nechá se 3 h stát a potom se zfiltruje. Baňka a filtr se promyjí *vodou prostou oxidu uhličitého R*, promývací tekutina se spojí s filtrátem a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS1*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebují nejvýše 3,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 g/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,1 %.

Stanovení obsahu

Ke 2,000 g v 500ml kuželové baňce se přidá 100 ml *acetonu R* a 10 ml *vody R*. Baňka se uzavře a míchá se na magnetické míchačce do úplného rozpuštění. Přidá se 30,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* za stálého míchání. Baňka se uzavře a míchá se na magnetické míchačce 30 min. Potom se přidá 100 ml horké *vody R*, stěny baňky se opláchnou a míchá se ještě 2 min. Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

Obsah acetylových skupin vyjádřený v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{4{,}305(n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *kyseliny sírové 0,5 mol/l VS* zjištěnou při titraci v mililitrech,
n_2 - spotřebu *kyseliny sírové 0,5 mol/l VS* zjištěnou při slepé zkoušce v mililitrech.

Uchovávání

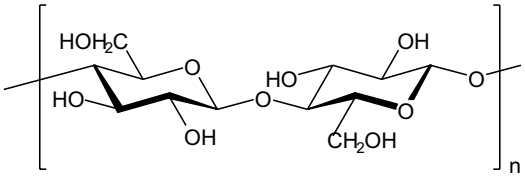
V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede obsah acetylových skupin v procentech.

Cellulosi pulvis

Celulosový prášek



$(C_6H_{10}O_5)_n$ CAS 9004-34-6

Je to čištěná, mechanicky rozmělněná celulosa získaná zpracováním alfa-celulosy jako buničiny z vláknitého rostlinného materiálu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný nebo zrnitý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v acetonu, v ethanolu, v toluenu, ve zředěných kyselinách a ve většině organických rozpouštědel, těžce rozpustný v roztoku hydroxidu sodného (50 g/l).

Zkoušky totožnosti

A. Asi 10 mg se umístí na hodinové sklíčko a disperguje se ve 2 ml *chloridu zinečnatého s jodem RS*; látka se zbarví fialovomodře.

B. 0,250 g se převede do 125ml kuželové baňky, přidá se 25,0 ml *vody R* a 25,0 ml *hydroxidu di(ethylendiamin)měďnatého 1 mol/l RS*. Obsah baňky se ihned probublá *dusíkem R*, baňka se uzavře a třepe se do úplného rozpuštění směsi. 7,0 ml se převede do vhodného kapilárního viskozimetru *(2.2.9)*. Roztok se ustaluje při (25 ± 0,1) °C nejméně po dobu 5 min. Zaznamená se čas průtoku t_1 v sekundách mezi dvěma značkami na viskozimetru. Vypočítá se kinematická viskozita ν_1 roztoku podle vzorce:

$$t_1(k_1),$$

v němž značí:
k_1 - konstantu viskozimetru.

Hydroxid di(ethylendiamin)měďnatý 1 mol/l RS se zředí na vhodný objem stejným objemovým dílem *vody R* a měří se průtokový čas t_2 v sekundách za použití vhodného kapilárního viskozimetru. Vypočítá se kinematická viskozita ν_2 rozpouštědla podle vzorce:

$$t_2(k_2)'$$

v němž značí:
k_2 - konstantu viskozimetru.

Stanoví se relativní viskozita η_{rel} zkoušené látky podle vzorce:

$$\eta_1/\eta_2.$$

Stanoví se vnitřní viskozita $[\eta]c$ interpolací pomocí tabulky vnitřní viskozity. Vypočítá se stupeň polymerizace P pomocí vzorce:

$$\frac{95[\eta]c}{m[(100 - b)/100]},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
b - ztrátu sušením v procentech.
Stupeň polymerizace je nejméně 440.

Zkoušky na čistotu

Rozpustnost. 50 mg se rozpustí v 10 ml *zkoumadla tetraaminměďnatého RS*; látka se rozpustí beze zbytku.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,5; měří se supernatantní tekutina získaná smícháním 10 g s 90 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po 1 h stání za občasného zamíchání.

Látky rozpustné v etheru. Připraví se sloupec naplněním 10,0 g do trubice o vnitřním průměru 20 mm. Sloupcem se nechá prokapávat 50 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Eluát se odpaří do sucha. Zbytek váží nejvýše 15,0 mg (0,15 %).

Látky rozpustné ve vodě. 6,0 g se smíchá s 90 ml čerstvě převařené a ochlazené *vody R*, nechá se 10 min stát za občasného promíchání a zfiltruje se. Prvních 10 ml filtrátu se odstraní, což se opakuje za použití stejného filtru podle potřeby do získání čirého filtrátu. 15,0 ml se v předem zvážené odpařovací misce odpaří na vodní lázni do sucha a pak se 1 h suší při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 15,0 mg (1,5 %).

Škrob. K 10 g se přidá 90 ml *vody R*, 5 min se vaří a ještě za horka se zfiltruje. Po ochlazení se přidá 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*; nevznikne modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 6,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých aerobních mikroorganismů, z toho nejvýše 10^2 hub, v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* a *Salmonella (2.6.13)*.

Tabulka vnitřní viskozity

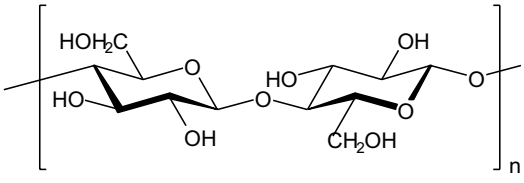
Vnitřní viskozita $[\eta]c$, při rozdílných hodnotách relativní viskozity η_{rel}

η_{rel}	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
1,1	0,098	0,106	0,115	0,125	0,134	0,143	0,152	0,161	0,170	0,180
1,2	0,189	0,198	0,207	0,216	0,225	0,233	0,242	0,250	0,259	0,268
1,3	0,276	0,285	0,293	0,302	0,310	0,318	0,326	0,334	0,342	0,350
1,4	0,358	0,367	0,375	0,383	0,391	0,399	0,407	0,414	0,422	0,430
1,5	0,437	0,445	0,453	0,460	0,468	0,476	0,484	0,491	0,499	0,507
1,6	0,515	0,522	0,529	0,536	0,544	0,551	0,558	0,566	0,573	0,580
1,7	0,587	0,595	0,602	0,608	0,615	0,622	0,629	0,636	0,642	0,649
1,8	0,656	0,663	0,670	0,677	0,683	0,690	0,697	0,704	0,710	0,717
1,9	0,723	0,730	0,736	0,743	0,749	0,756	0,762	0,769	0,775	0,782
2,0	0,788	0,795	0,802	0,809	0,815	0,821	0,827	0,833	0,840	0,846
2,1	0,852	0,858	0,864	0,870	0,876	0,882	0,888	0,894	0,900	0,906
2,2	0,912	0,918	0,924	0,929	0,935	0,941	0,948	0,953	0,959	0,965
2,3	0,971	0,976	0,983	0,988	0,994	1,000	1,006	1,011	1,017	1,022
2,4	1,028	1,033	1,039	1,044	1,050	1,056	1,061	1,067	1,072	1,078
2,5	1,083	1,089	1,094	1,100	1,105	1,111	1,116	1,121	1,126	1,131
2,6	1,137	1,142	1,147	1,153	1,158	1,163	1,169	1,174	1,179	1,184
2,7	1,190	1,195	1,200	1,205	1,210	1,215	1,220	1,225	1,230	1,235
2,8	1,240	1,245	1,250	1,255	1,260	1,265	1,270	1,275	1,280	1,285
2,9	1,290	1,295	1,300	1,305	1,310	1,314	1,319	1,324	1,329	1,333
3,0	1,338	1,343	1,348	1,352	1,357	1,362	1,367	1,371	1,376	1,381
3,1	1,386	1,390	1,395	1,400	1,405	1,409	1,414	1,418	1,423	1,427
3,2	1,432	1,436	1,441	1,446	1,450	1,455	1,459	4,464	1,468	1,473
3,3	1,477	1,482	1,486	1,491	1,496	1,500	1,504	1,508	1,513	1,517
3,4	1,521	1,525	1,529	1,533	1,537	1,542	1,546	1,550	1,554	1,558
3,5	1,562	1,566	1,570	1,575	1,579	1,583	1,587	1,591	1,595	1,600
3,6	1,604	1,608	1,612	1,617	1,621	1,625	1,629	1,633	1,637	1,642
3,7	1,646	1,650	1,654	1,658	1,662	1,666	1,671	1,675	1,679	1,683
3,8	1,687	1,691	1,695	1,700	1,704	1,708	1,712	1,715	1,719	1,723
3,9	1,727	1,731	1,735	1,739	1,742	1,746	1,750	1,754	1,758	1,762

η_{rel}	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
4,0	1,765	1,769	1,773	1,777	1,781	1,785	1,789	1,792	1,796	1,800
4,1	1,804	1,808	1,811	1,815	1,819	1,822	1,826	1,830	1,833	1,837
4,2	1,841	1,845	1,848	1,852	1,856	1,859	1,863	1,867	1,870	1,874
4,3	1,878	1,882	1,885	1,889	1,893	1,896	1,900	1,904	1,907	1,911
4,4	1,914	1,918	1,921	1,925	1,929	1,932	1,936	1,939	1,943	1,946
4,5	1,950	1,954	1,957	1,961	1,964	1,968	1,971	1,975	1,979	1,982
4,6	1,986	1,989	1,993	1,996	2,000	2,003	2,007	2,010	2,013	2,017
4,7	2,020	2,023	2,027	2,030	2,033	2,037	2,040	2,043	2,047	2,050
4,8	2,053	2,057	2,060	2,063	2,067	2,070	2,073	2,077	2,080	2,083
4,9	2,087	2,090	2,093	2,097	2,100	2,103	2,107	2,110	2,113	2,116
5,0	2,119	2,122	2,125	2,129	2,132	2,135	2,139	2,142	2,145	2,148
5,1	2,151	2,154	2,158	2,160	2,164	2,167	2,170	2,173	2,176	2,180
5,2	2,183	2,186	2,190	2,192	2,195	2,197	2,200	2,203	2,206	2,209
5,3	2,212	2,215	2,218	2,221	2,224	2,227	2,230	2,233	2,236	2,240
5,4	2,243	2,246	2,249	2,252	2,255	2,258	2,261	2,264	2,267	2,270
5,5	2,273	2,276	2,279	2,282	2,285	2,288	2,291	2,294	2,297	2,300
5,6	2,303	2,306	2,309	2,312	2,315	2,318	2,320	2,324	2,326	2,329
5,7	2,332	2,335	2,338	2,341	2,344	2,347	2,350	2,353	2,355	2,358
5,8	2,361	2,364	2,367	2,370	2,373	2,376	2,379	2,382	2,384	2,387
5,9	2,390	2,393	2,396	2,400	2,403	2,405	2,408	2,411	2,414	2,417
6,0	2,419	2,422	2,425	2,428	2,431	2,433	2,436	2,439	2,442	2,444
6,1	2,447	2,450	2,453	2,456	2,458	2,461	2,464	2,467	2,470	2,472
6,2	2,475	2,478	2,481	2,483	2,486	2,489	2,492	2,494	2,497	2,500
6,3	2,503	2,505	2,508	2,511	2,513	2,516	2,518	2,521	2,524	2,526
6,4	2,529	2,532	2,534	2,537	2,540	2,542	2,545	2,547	2,550	2,553
6,5	2,555	2,558	2,561	2,563	2,566	2,568	2,571	2,574	2,576	2,579
6,6	2,581	2,584	2,587	2,590	2,592	2,595	2,597	2,600	2,603	2,605
6,7	2,608	2,610	2,613	2,615	2,618	2,620	2,623	2,625	2,627	2,630
6,8	2,633	2,635	2,637	2,640	2,643	2,645	2,648	2,650	2,653	2,655
6,9	2,658	2,660	2,663	2,665	2,668	2,670	2,673	2,675	2,678	2,680
7,0	2,683	2,685	2,687	2,690	2,693	2,695	2,698	2,700	2,702	2,705
7,1	2,707	2,710	2,712	2,714	2,717	2,719	2,721	2,724	2,726	2,729
7,2	2,731	2,733	2,736	2,738	2,740	2,743	2,745	2,748	2,750	2,752
7,3	2,755	2,757	2,760	2,762	2,764	2,767	2,769	2,771	2,774	2,776
7,4	2,779	2,781	2,783	2,786	2,788	2,790	2,793	2,795	2,798	2,800
7.5	2,802	2,805	2,807	2,809	2,812	2,814	2,816	2,819	2,821	2,823
7,6	2,826	2,828	2,830	2,833	2,835	2,837	2,840	2,842	2,844	2,847
7,7	2,849	2,851	2,854	2,856	2,858	2,860	2,863	2,865	2,868	2,870
7,8	2,873	2,875	2,877	2,879	2,881	2,884	2,887	2,889	2,891	2,893
7,9	2,895	2,898	2,900	2,902	2,905	2,907	2,909	2,911	2,913	2,915
8,0	2,918	2,920	2,922	2,924	2,926	2,928	2,931	2,933	2,935	2,937
8,1	2,939	2,942	2,944	2,946	2,948	2,950	2,952	2,955	2,957	2,959
8,2	2,961	2,963	2,966	2,968	2,970	2,972	2,974	2,976	2,979	2,981
8,3	2,983	2,985	2,987	2,990	2,992	2,994	2,996	2,998	3,000	3,002
8,4	3,004	3,006	3,008	3,010	3,012	3,015	3,017	3,019	3,021	3,023
8,5	3,025	3,027	3,029	3,031	3,033	3,035	3,037	3,040	3,042	3,044
8,6	3,046	3,048	3,050	3,052	3,054	3,056	3,058	3,060	3,062	3,064
8,7	3,067	3,069	3,071	3,073	3,075	3,077	3,079	3,081	3,083	3,085
8,8	3,087	3,089	3,092	3,094	3,096	3,098	3,100	3,102	3,104	3,106
8,9	3,108	3,110	3,112	3,114	3,116	3,118	3,120	3,122	3,124	3,126
9,0	3,128	3,130	3,132	3,134	3,136	3,138	3,140	3,142	3,144	3,146
9,1	3,148	3,150	3,152	3,154	3,156	3,158	3,160	3,162	3,164	3,166
9,2	3,168	3,170	3,172	3,174	3,176	3,178	3,180	3,182	3,184	3,186
9,3	3,188	3,190	3,192	3,194	3,196	3,198	3,200	3,202	3,204	3,206
9,4	3,208	3,210	3,212	3,214	3,215	3,217	3,219	3,221	3,223	3,225
9,5	3,227	3,229	3,231	3,233	3,235	3,237	3,239	3,241	3,242	3,244
9,6	3,246	3,248	3,250	3,252	3,254	3,256	3,258	3,260	3,262	3,264
9,7	3,266	3,268	3,269	3,271	3,273	3,275	3,277	3,279	3,281	3,283
9,8	3,285	3,287	3,289	3,291	3,293	3,295	3,297	3,298	3,300	3,302
9,9	3,304	3,305	3,307	3,309	3,311	3,313	3,316	3,318	3,320	3,321
10	3,32	3,34	3,36	3,37	3,39	3,41	3,43	3,45	3,46	3,48
11	3,50	3,52	3,53	3,55	3,56	3,58	3,60	3,61	3,63	3,64
12	3,66	3,68	3,69	3,71	3,72	3,74	3,76	3,77	3,79	3,80
13	3,80	3,83	3,85	3,86	3,88	3,89	3,90	3,92	3,93	3,95
14	3,96	3,97	3,99	4,00	4,02	4,03	4,04	4,06	4,07	4,09
15	4,10	4,11	4,13	4,14	4,15	4,17	4,18	4,19	4,20	4,22
16	4,23	4,24	4,25	4,27	4,28	4,29	4,30	4,31	4,33	4,34
17	4,35	4,36	4,37	4,38	4,39	4,41	4,42	4,43	4,44	4,45
18	4,46	4,47	4,48	4,49	4,50	4,52	4,53	4,54	4,55	4,56
19	4,57	4,58	4,59	4,60	4,61	4,62	4,63	4,64	4,65	4,66

Cellulosum microcristallinum

Mikrokrystalická celulosa



Je to čištěná, částečně depolymerizovaná celulosa připravená působením minerálních kyselin na alfa-celulosu, získanou jako buničinu z vláknitého rostlinného materiálu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný nebo zrnitý prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, v acetonu, v ethanolu, v toluenu, ve zředěných kyselinách a v roztoku hydroxidu sodného (50 g/l).

Zkoušky totožnosti

A. Asi 10 mg se umístí na hodinové sklíčko a disperguje se ve 2 ml *chloridu zinečnatého s jodem RS*; látka se zbarví fialově modře.

B. 1,300 g se převede do 125ml kuželové baňky, přidá se 25,0 ml *vody R* a 25,0 ml *hydroxidu di(ethylendiamin)měďnatého 1 mol/l RS*. Obsah baňky se ihned probublá *dusíkem R*, baňka se uzavře a třepe se do úplného rozpuštění směsi. 7,0 ml se převede do vhodného kapilárního viskozimetru *(2.2.9)*. Roztok se ustaluje při (25 ± 0,1) °C nejméně po dobu 5 min. Zaznamená se čas průtoku t_1 v sekundách mezi dvěma značkami na viskozimetru. Vypočítá se kinematická viskozita ν_1 roztoku podle vzorce:

$$t_1(k_1),$$

v němž značí:
k_1 - konstantu viskozimetru.

Hydroxid di(ethylendiamin)měďnatý 1 mol/l RS se zředí na vhodný objem stejným objemovým dílem *vody R* a měří se průtokový čas t_2 v sekundách za použití vhodného kapilárního viskozimetru. Vypočítá se kinematická viskozita ν_2 rozpouštědla podle vzorce:

$$t_2(k_2)'$$

v němž značí:
k_2 - konstantu viskozimetru.

Stanoví se relativní viskozita η_{rel} zkoušené látky podle vzorce:

$$\eta_1/\eta_2.$$

Stanoví se vnitřní viskozita $[\eta]c$ interpolací pomocí tabulky vnitřní viskozity (viz článek *Cellulosi pulvis*). Vypočítá se stupeň polymerizace P pomocí vzorce:

$$\frac{95[\eta]c}{m[(100 - b)/100]},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
b - ztrátu sušením v procentech.
Stupeň polymerizace je nejvýše 350.

Zkoušky na čistotu

Rozpustnost. 50 mg se rozpustí v 10 ml *zkoumadla tetraaminměďnatého RS*; látka se rozpustí beze zbytku.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,5; měří se supernatantní tekutina získaná centrifugací suspenze připravené třepáním 5 g se 40 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po dobu 20 min.

Látky rozpustné v etheru. Připraví se sloupec naplněním 10,0 g do trubice o vnitřním průměru 20 mm. Sloupcem se nechá prokapávat 50 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Eluát se odpaří do sucha. Zbytek váží nejvýše 5,0 mg (0,05 %).

Látky rozpustné ve vodě. 5,0 g se protřepává 10 min s 80 ml *vody R* a zfiltruje se za použití vakua do předem zvážené baňky. Filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se 1 h suší při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 12,5 mg (0,25 %).

Škrob. K 10 g se přidá 90 ml *vody R*, 5 min se vaří a ještě za horka se zfiltruje. Po ochlazení se přidá 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*; nevznikne modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 6,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých aerobních mikroorganismů, z toho nejvýše 10^2 hub, v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* a *Salmonella (2.6.13)*.

Centaurii herba

N

Zeměžlučová nať

Synonymum. Herba centaurii

Je to celá nebo řezaná, usušená kvetoucí nať druhu *Centaurium erythraea* RAFN (*synonyma*: *Centaurium minus* MOENCH, *Centaurium umbellatum* GILIB., *Erythraea centaurium* (L.) PERS).

Vlastnosti

Droga intenzivně hořké chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek dutý, válcovitý, světle zelený až hnědý, podélně rýhovaný, jen v horní části větvený. Listy přisedlé, celokrajné, vstřícné, podlouhle vejčité až kopinaté, až 3 cm dlouhé; na obou stranách lysé, zelené až hnědavě zelené. Květy uspořádány ve vrcholíkovitých vidlanech. Kalich pětičetný, zelený, kališní ušty kopinaté. Koruna pětičetná, řepicovitá, růžově červená, korunní cípy asi 5 mm až 8 mm dlouhé, korunní trubka bělavá. Koruna delší než kalich. Tyčinek pět, nitky srostlé s korunou. Semeník svrchní s krátkou čnělkou a široce dvojklannou bliznou. Válcovitá tobolka asi 7 mm až 10 mm dlouhá, s četnými malými, hnědými semeny.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelenožlutý až nahnědlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky stonku se sklerenchymatickými vlákny a šroubovitě, síťovitě a tečkovaně ztlustlými cévami s úzkým luminem; buňky dřeně pravoúhlé s tečkovanými stěnami; úlomky listů s buňkami pokožky vlnitě zprohýbanými, anizocytickými průduchy (*2.8.3*) a buňkami mezofylu s různými krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky kalicha a koruny s buňkami pokožky tupě papilózními a s kutikulou paprsčitě zvrásněnou; části endothecia se síťovitě nebo žebříčkovitě ztlustlými stěnami; pylová zrna zaobleně trojhranná až oválná, žlutá, o průměru asi 30 μm, s jemně zrnitou exinou a třemi klíčními póry; úlomky stěn tobolky složené ze vzájemně se křížících vrstev vláknitých buněk; malá, žlutohnědá semena s vyniklou tmavohnědou, síťovitou strukturou, tvořenou hrubými bočními stěnami buněk pokožky.

C. Provede se tenkovrstvá chromatogramie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (500) se smíchá s 20 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 10 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.*

Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *ethylacetatu R* (16 + 16 + 69) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a vyvíjí se stejným způsobem ještě jednou. Usuší se v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna (swertiamarin) na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné i další velmi slabě zbarvené skvrny. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je žlutohnědá skvrna (rutin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna swertiamarinu zbarvena hnědě, těsně nad ní je slabá, nažloutlá skvrna, mezi touto skvrnou a čelem chromatogramu je několik většinou šedých, velmi slabě zbarvených skvrn, na čele chromatogramu je červenofialová skvrna. Pod skvrnou swertiamarinu je intenzivní, slabě difuzní žlutá skvrna. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna swertiamarinu na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivně hnědá až hnědožlutá, těsně nad ní je světle zelená až žlutozelená skvrna, mezi touto skvrnou a čelem chromatogramu je několik namodralých nebo nažloutlých skvrn, čelo chromatogramu je zbarveno slabě červenofialově. Pod skvrnou swertiamarinu jsou intenzivní světle zelené až žlutozelené skvrny a slabě zbarvené, nahnědlé skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 %.

Číslo hořkosti. Nejméně 2000. Provádí se srovnáním s chininiumchloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000. Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění, které chutná ještě hořce.

Základní roztok chininiumchloridu. 0,100 g *chininiumchloridu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 1,00 g práškované drogy (710) se přelije 1000 ml vroucí *vody R* a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, prvních 20 ml filtrátu se odstraní.

Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 4,2 ml základního roztoku chininiumchloridu a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Určí se roztok nejnižší koncentrace, který chutná ještě hořce. 10,0 ml roztoku nejnižší koncentrace se převaluje v ústech 30 s tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka. Jestliže roztok nechutná hořce, vyplivne se a po 1 min se ústa vypláchnou vodou. Po 10 min se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor k se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{5{,}00}{n},$$

v němž značí:
n - počet ml základního roztoku chininiumchloridu, který chutnal ještě hořce.

10/k ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku chutná hořce.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Cera alba

Bílý vosk

CAS 8012-89-3

Je to včelí vosk získaný bělením žlutého včelího vosku.

Vlastnosti

Bílé nebo nažloutlé kousky nebo destičky, v tenké vrstvě průsvitné, na lomu jemně zrnité, matné, nikoli krystalické; zahřátím v dlani měkne a stává se tvárným. Pach nevýrazný, medový, jemnější než u žlutého vosku, nikdy není žluklý. Vosk bez chuti, nelepí se na zuby.

Je prakticky nerozpustný ve vodě; částečně se rozpouští v horkém lihu 90% (*V/V*) a v etheru, za horka se rozpouští v mastných olejích a silicích.

Relativní hustota je asi 0,96.

Zkoušky totožnosti

Teplota skápnutí (*2.2.17*). 61 °C až 65 °C. Zkoušená látka se rozpustí zahřátím na vodní lázni, nalije se na skleněnou desku a nechá se vychladnout na polotuhou hmotu. Kovový kelímek se vtlačí širším koncem do zkoušené látky, postup se opakuje tak dlouho, dokud není zkoušená látka vytlačována úzkým otvorem. Přebytek vosku se odstraní kopistkou a dovnitř se okamžitě vloží teploměr. Vytlačený vosk se odstraní. Po 12 h stání při obyčejné teplotě se stanoví teplota skápnutí.

Číslo kyselosti. 17 až 24. 2,00 g se v 250ml kuželové baňce smíchají s 40 ml *xylenu R*, přidá se několik varných kamínků a zahřívá se pod zpětným chladičem do rozpuštění. Přidá se 20 ml *lihu 96% R*, 0,5 ml *fenolftaleinu RS1* a ještě horký roztok se titruje *hydroxidem draselným v lihu 0,5 mol/l VS* až do vzniku červeného zbarvení, které je stálé nejméně 10 s. Provede se slepá zkouška.

Číslo kyselosti se vypočítá podle vzorce:

$$x = \frac{28{,}05 \,.\, (n_1 - n_2)}{m},$$

v němž značí:
n_1 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech (vlastní stanovení),
n_2 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech (slepá zkouška),
m - navážku zkoušené látky v gramech.

Číslo esterové (*2.5.2*). 70 až 80.

Poměr čísel. Poměr čísla esterového k číslu kyselosti je 3,3 až 4,3.

Číslo zmýdelnění. 87 až 104. 2,00 g se v 250ml kuželové baňce smíchají s 30 ml směsi stejných objemových dílů *xylenu R* a *lihu 96% R*, přidá se několik varných kamínků a zahřívá se pod zpětným chladičem do rozpuštění. Přidá se 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 3 h pod zpětným chladičem. Přidá se 1 ml *fenolftaleinu RS1;* ještě horký roztok se ihned titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS*. Roztok se během titrace několikrát zahřeje k varu. Provede se slepá zkouška.

Číslo zmýdelnění se vypočítá podle vzorce:

$$x = \frac{28{,}05 \,.\, (n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:
n_1 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* v mililitrech (vlastní stanovení),
n_2 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* v mililitrech (slepá zkouška),
m - navážku zkoušené látky v gramech.

Ceresin, parafiny a některé další vosky. 3,0 g se v baňce na 100 ml smíchají s 30 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (40 g/l) v *lihu 96% prostém aldehydů R* a mírně se vaří 2 h pod zpětným chladičem. Zpětný chladič se odstraní a do baňky se ihned vloží teploměr. Baňka se vloží do vody 80 °C teplé a za stálého míchání se roztok nechá chladnout. Při teplotě vyšší než 65 °C nevzniká sraženina; roztok může opalizovat.

Glycerol a jiné polyoly. 0,20 g se smíchá s 10 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a zahřívá se 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Pak se přidá 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS;* po ochlazení se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí *kyselinou sírovou zředěnou RS*. Spojené filtráty

a promývací tekutiny se zředí *kyselinou sírovou zředěnou RS* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se ve zkumavce smíchá s 0,5 ml roztoku *jodistanu sodného R* (10,7 g/l) a nechá se 5 min stát. Přidá se 1,0 ml *fuchsinu RS*. Případně vzniklá sraženina zmizí. Zkumavka se vloží do kádinky naplněné vodou 40 °C teplou. Nechá se chladnout a pozoruje se 10 min až 15 min. Modrofialové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 1,0 ml roztoku *glycerolu R* (0,01 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS* (0,5 %, počítáno jako glycerol).

Cera carnauba

Karnaubský vosk

CAS 8015-86-9

Je to čištěný vosk získaný z listů druhu *Copernicia cerifera* MART.

Vlastnosti

Světle žlutý nebo žlutý prášek, vločky nebo tuhá hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustný v horkém ethylacetatu a xylenu.

Relativní hustota je asi 0,97.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí zahřátím v 5 ml *chloroformu R*. Použije se horký roztok.
Porovnávací roztok. 5 mg *mentholu R*, 5 µl *menthylacetatu R* a 5 mg *thymolu R* se rozpustí v 10 ml *toluenu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 30 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *chloroformu R* (2 + 98) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu. Postříká se čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* (asi 20 ml na desku 200 x 200 mm) a suší se 10 min až 15 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve spodní části tmavomodrá skvrna (menthol) a nad ní načervenalá skvrna (thymol); v horní části tmavomodrá skvrna (menthylacetat). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna intenzivní modrá skvrna (triakontanol = melissylol) v poloze vymezené skvrnami thymolu a mentholu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Další modré skvrny jsou v horní části chromatogramu zkoušeného roztoku v poloze vymezené skvrnami menthylacetatu a thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku; nad těmito skvrnami jsou další skvrny; skvrna s nejvyšší hodnotou R_F je velmi intenzivní. Pod skvrnou triakontalu jsou četné, nevýrazné skvrny; start je zbarven modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,10 g se rozpustí zahřátím v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než roztok *dichromanu draselného R* (0,05 g/l) (*2.2.2, Metoda II*).

Teplota tání (*2.2.15*). 80 °C až 88 °C. Zkoušená látka se opatrně roztaví na vodní lázni a naplní se do otevřených skleněných kapilár. Kapiláry se pak nechají stát 24 h při teplotě nepřevyšující 10 °C nebo 2 h při 0 °C.

Číslo kyselosti. 2 až 7. 2,000 g se v 250ml kuželové baňce smíchají se 40 ml *xylenu R*, přidá se několik skleněných kuliček a zahřívá se pod zpětným chladičem až do úplného rozpuštění. Přidá se 20 ml *lihu 96% R* a 1 ml *fenolftaleinu RS1* a horký roztok se titruje *hydroxidem draselným v lihu 0,5 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení, které je stálé nejméně 10 s. Provede se slepá zkouška. Číslo kyselosti se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{28{,}05\ .\ (n_1 - n_2)}{m},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech,
n_2 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* při slepé zkoušce v mililitrech.

Číslo zmýdelnění. 78 až 95. Ztitrovaný roztok ze zkoušky Číslo kyselosti se smíchá s 20,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 3 h pod zpětným chladičem. Přidá se 1 ml *fenolftaleinu RS1* a ještě horký červeně zbarvený roztok se ihned titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do odbarvení. Roztok se znovu zahřeje k varu, a je-li třeba, pokračuje se v titraci; postup se opakuje tak dlouho, dokud se mění zbarvení roztoku při zahřívání. Provede se slepá zkouška. Číslo zmýdelnění se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{28{,}05\ .\ (n_4 - n_3)}{m} + \text{číslo kyselosti},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n_3 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* v mililitrech,
n_4 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* při slepé zkoušce v mililitrech.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 0,25 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Cera flava

Žlutý vosk

Je to včelí vosk získaný roztavením stěn pláství vytvořených včelou medonosnou, *Apis mellifera* L., v horké vodě, zbavený cizích příměsí.

Vlastnosti

Žluté nebo světle hnědé kousky nebo destičky, na lomu jemně zrnité, matné, nikoli krystalické; pach nevýrazný, medový. Vosk bez chuti, nelepí se na zuby. Zahřátím v dlani měkne a stává se tvárným.

Je prakticky nerozpustný ve vodě; částečně se rozpouští v horkém lihu 90% (*V/V*) a v etheru, zcela se rozpouští v mastných olejích a silicích.

Relativní hustota je asi 0,96.

Zkoušky totožnosti

Teplota skápnutí (*2.2.17*). 61 C až 65 C. Zkoušená látka se rozpustí zahřátím na vodní lázni, nalije se na skleněnou desku a nechá se vychladnout na polotuhou hmotu. Kovový kelímek se vtlačí širším koncem do zkoušené látky, postup se opakuje tak dlouho, dokud není zkoušená látka vytlačována úzkým otvorem. Přebytek vosku se odstraní kopistkou a dovnitř se okamžitě vloží teploměr. Vytlačený vosk se odstraní. Po 12 h stání při obyčejné teplotě se stanoví teplota skápnutí.

Číslo kyselosti. 17 až 22. 2,00 g se v 250ml kuželové baňce smíchají s 40 ml *xylenu R*, přidá se několik varných kamínků a zahřívá se pod zpětným chladičem do rozpuštění. Přidá se 20 ml *lihu 96% R*, 0,5 ml *fenolftaleinu RS1* a ještě horký roztok se titruje *hydroxidem draselným v lihu 0,5 mol/l VS* až do vzniku červeného zbarvení, které je stálé nejméně 10 s. Provede se slepá zkouška.

Číslo kyselosti se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{28{,}05 \ . \ (n_1 \quad n_2)}{m},$$

v němž značí:
n_1 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech (vlastní stanovení),
n_2 - spotřebu *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* v mililitrech (slepá zkouška),
m - navážku zkoušené látky v gramech.

Číslo esterové (*2.5.2*). 70 až 80.

Poměr čísel. Poměr čísla esterového k číslu kyselosti je 3,3 až 4,3.

Číslo zmýdelnění. 87 až 102. 2,00 g se v 250ml kuželové baňce smíchají s 30 ml směsi stejných objemových dílů *xylenu R* a *lihu 96% R*, přidá se několik varných kamínků a zahřívá se pod zpětným chladičem do rozpuštění. Přidá se 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 3 h pod zpětným chladičem. Přidá se 1 ml *fenolftaleinu RS1*; ještě horký roztok se ihned titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS*. Roztok se během titrace několikrát zahřeje k varu. Provede se slepá zkouška.

Číslo zmýdelnění se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{28{,}05 \ . \ (n_2 \quad n_1)}{m},$$

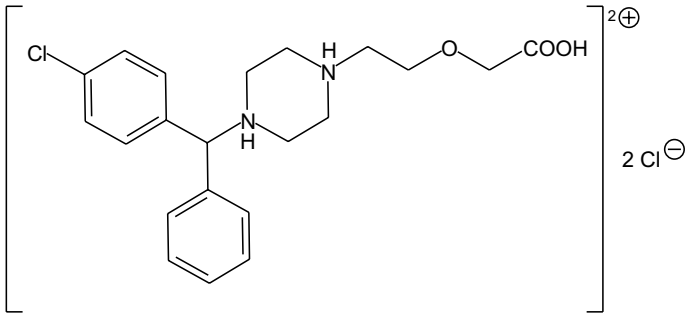
v němž značí:
n_1 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* v mililitrech (vlastní stanovení),
n_2 - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l VS* v mililitrech (slepá zkouška),
m - navážku zkoušené látky v gramech.

Ceresin, parafiny a některé další vosky. 3,0 g se v 100ml baňce smíchají s 30 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (40 g/l) v *lihu 96% prostém aldehydů R* a mírně se vaří 2 h pod zpětným chladičem. Zpětný chladič se odstraní a do baňky se ihned umístí teploměr. Baňka se vloží do vody 80 °C teplé a za stálého míchání se roztok nechá chladnout. Při teplotě vyšší než 65 °C nevzniká sraženina; roztok může opalizovat.

Glycerol a jiné polyoly. K 0,20 g se přidá 10 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a zahřívá se 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Pak se přidá 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS;* po ochlazení se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí *kyselinou sírovou zředěnou RS*. Spojené filtráty a promývací tekutiny se zředí *kyselinou sírovou zředěnou RS* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se ve zkumavce smíchá s 0,5 ml roztoku *jodistanu sodného R* (10,7 g/l) a nechá se 5 min stát. Přidá se 1,0 ml *fuchsinu RS*. Případně vzniklá sraženina zmizí. Zkumavka se vloží do kádinky naplněné vodou 40 °C teplou. Nechá se chladnout a pozoruje se 10 min až 15 min. Modrofialové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 1,0 ml roztoku *glycerolu R* (0,01 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS* (0,5 %, počítáno jako glycerol).

† Cetirizini dihydrochloridum

Cetiriziniumdichlorid



$C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$ M_r 461,81 CAS 83881-52-1

Je to *(RS)*-4-(4-chlorbenzhydryl)-1-acetoxyethylpiperaziniumdichlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 210 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 231 nm. Specifická absorbance v maximu je 359 až 381.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cetiriziniumdichloridu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cetiriziniumdichloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *chlorphenaminmaleinatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% RS*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 1,2 až 1,8; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *cetiriziniumdichloridu CRL* a 5,0 mg *cetirizinu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny sírové zředěné RS, vody R* a *acetonitrilu R* (0,4 + 6,6 + 93); průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se odděleně 20 μl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků byla okolo 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (cetirizin) a druhým píkem (cetirizin nečistota A) není menší než 3 a faktor symetrie není větší než 2,0.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatografie se provádí po dobu odpovídající nejméně 3násobku retenčního času cetirizinu. Na chromatogramu

zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %); součet ploch všech těchto píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %). K píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se nepřihlíží.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1,0 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

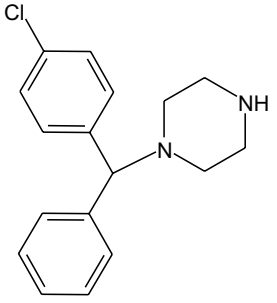
0,100 g se rozpustí v 70 ml směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (30 + 70) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* do druhé inflexe. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,39 mg $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$.

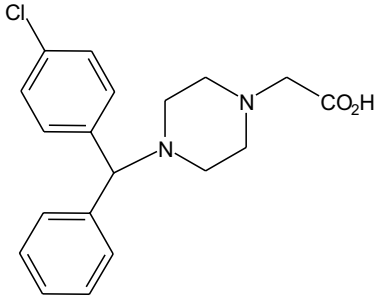
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

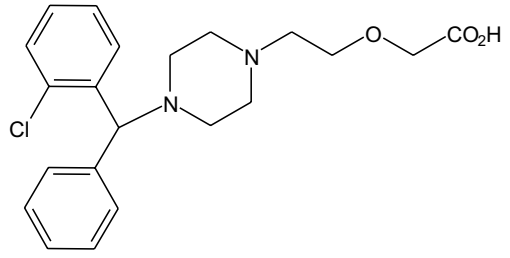
Nečistoty



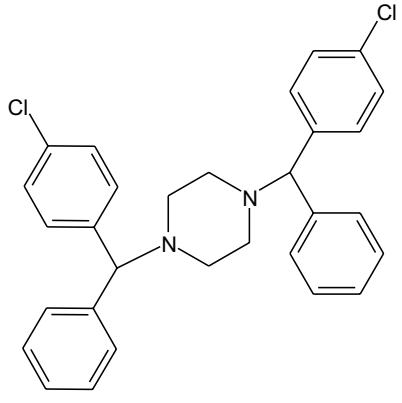
A. (*RS*)-1-(4-chlorbenzhydryl)piperazin,



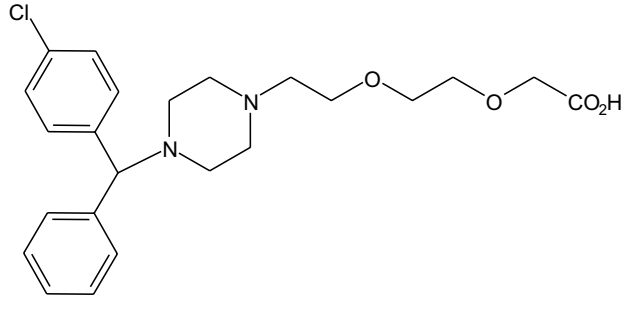
B. kyselina (*RS*)-2-[4-(4-chlorbenzhydryl)piperazin-1-yl]octová,



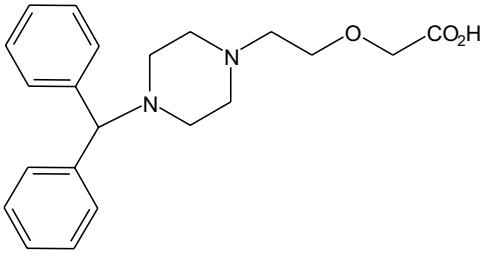
C. kyselina (*RS*)-2-{2-[4-(2-chlorbenzhydryl)piperazin-1-yl]ethoxy}octová,



D. bis(4-chlorbenzhydryl)piperazin,



E. kyselina (*RS*)-2-{2-[2-[4-(4-chlorbenzhydryl)piperazin-1-yl]ethoxy]}octová (ethoxycetirizin),



F. kyselina (*RS*)-2-{2-[(4-benzhydryl)piperazin-1-yl]ethoxy}octová.

Cetostearomacrogolum

Cetostearomakrogol

Synonymum. Macrogoli aetherum cetostearylicum

Je to směs etherů směsných makrogolů s lineárními mastnými alkoholy, hlavně cetylstearylalkoholem. Může obsahovat volné makrogoly a proměnné množství volného cetylstearylalkoholu. Množství ethylenoxidu zreagovaného s cetylstearylalkoholem je 2 až 33 oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota).

Vlastnosti

Bílá nebo nažloutlá voskovitá mazlavá hmota, pelety, zrnka nebo vločky.

Cetostearomakrogol s nízkým počtem oxyethylenových jednotek v molekule je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Cetostearomakrogol s vyšším počtem oxyethylenových jednotek v molekule je dispergovatelný nebo dobře rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Tuhne při 32 °C až 52 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky podle následující tabulky 1 se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se touto směsí na 75 ml.

Tab. 1.

Počet oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota)	Navážka v g
2 - 6	5,0 g
10 - 22	10,0 g
25 - 33	15,0 g

Přidá se 60 ml *hexanu R* a protřepává se 3 min. Tvorbu pěny lze potlačit přídavkem několika kapek *lihu 96% R*. Hexanová vrstva se zfiltruje přes *síran sodný bezvodý R*, filtr se promyje třikrát 10 ml *hexanu R* a spojené filtráty se odpaří do sucha. 0,05 g vysušeného zbytku se rozpustí v 10 ml *methanolu R* (v některých případech roztok opalizuje).

Porovnávací roztok. 25 mg *stearylalkoholu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml.

Odděleně se nanese po 20 μl zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjí se *ethylacetatem R* po dráze 15 cm. Pak se vrstva usuší a postříká se zkoumadlem vanilin-kyselina sírová připraveným následujícím způsobem: 0,50 g *vanilinu R* se rozpustí v 50,0 ml *lihu 96% R* a

zředí se *kyselinou sírovou R* na 100,0 ml. Pak se vrstva usuší na vzduchu, zahřívá se 15 min při asi 130 °C a nechá se vychladnout na vzduchu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik skvrn, z nichž jedna odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

E. 0,1 g se rozpustí nebo disperguje v 5 ml *lihu 96% R,* přidají se 2 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 10 ml *chloridu barnatého RS1* a 10 ml roztoku *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l); vznikne sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 5 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50 ml. Tento roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. 2,0 g se rozpustí v horké směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v tabulce 2.

Tab. 2.

Počet oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota)	Číslo hydroxylové
2	150 - 180
3	135 - 155
5 - 6	100 - 134
10	75 - 90
12	67 - 77
15	58 - 67
20	45 - 55
22	41 - 51
25	36 - 46
30 - 33	32 - 40

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 2,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 3,0; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

1,4-Dioxan. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se postupem uvedeným ve stati Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do lahvičky vhodného objemu, přidá se 1,0 ml *vody R*, a je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do lahvičky vhodného objemu, přidá se 0,20 g ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R*. Je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.
Porovnávací roztok (b). K 0,1 g *ethylenoxidu RS* v lahvičce vhodné velikosti se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou a zátka se upevní hliníkovým nebo teflonovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Nástřik statického head-space postupu se obvykle provádí za použití:
- rovnovážné teploty: nejméně 70 °C,
- doby ohřevu: 45 min,
- teploty převodové kapiláry: 75 °C,
- nosného plynu: *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R*,
- doby tlakování: 30 s,
- objemu nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné nebo křemenné kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0 μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 2,0 a jestliže poměr signálu píku ethylenoxidu na stejném chromatogramu k signálu pozadí je nejméně 10.

Nastříkne se odděleně vhodný objem (např. 1 ml) plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Postup se opakuje ještě dvakrát. Na chromatogramu zkoušeného roztoku průměrná plocha píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina průměrné plochy píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 15 %.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T}{(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede počet oxyethylenových jednotek na molekulu cetylstearylalkoholu (jmenovitá hodnota).

Cetostearylis isononanoas

Cetostearylisononanoat

Je to směs esterů cetylstearylalkoholu s kyselinou isononanovou, hlavně kyselinou 3,5,5-trimethylhexanovou.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru petrolejovém, mísí se s mastnými oleji a s tekutým parafinem.

Viskozita je 15 mPa.s až 30 mPa.s, relativní hustota je 0,85 až 0,86 a index lomu je 1,44 až 1,45.

Zkoušky totožnosti

A. Po ochlazení pod 15 °C vzniká zákal.

B. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. pro cetostearylisononanoat.*

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarvena než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; stanoví se s 5,0 g.

Číslo hydroxylové *(2.5.3)*. Nejvýše 5,0 *(Metoda A)*.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 1,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 135 až 148; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

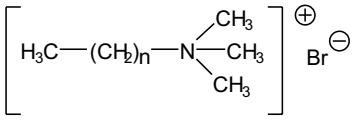
Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Cetrimidum

Cetrimid



(n = 11, 13, 15)

CAS 8044-71-1

Je to trimethyltetradecylamoniumbromid a může obsahovat malé množství dodecyl- a hexadecyltrimethylamoniumbromidů. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % alkyltrimethylamoniumbromidů, vyjádřených jako $C_{17}H_{38}BrN$ (M_r 336,40).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý objemný sypký prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 0,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25,0 ml. Absorbance roztoku *(2.2.25)* měřená při 260 nm až 280 nm není větší než 0,05.

B. 5 mg se rozpustí v 5 ml *tlumivého roztoku o pH 8,0* a vloží se proužek *papíru se zelení methylovou R*; po 5 min roztok vykazuje intenzivnější zelenomodré zbarvení než kontrolní roztok, připravený současně stejným způsobem.

C. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, při třepání silně pění.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného HF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.

Porovnávací roztok. 0,10 g *trimethyltetradecylamoniumbromidu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, roztoku *octanu sodného R* (270 g/l) a *methanolu R* (20 + 35 + 45) po dráze 12 cm. Vrstva se vysuší proudem horkého vzduchu, nechá se ochladit, vystaví se působení jodových par a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Aminy a aminové soli. 5,0 g se rozpustí ve 30 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a *methanolu R* (1 + 99) a přidá se 100 ml *2-propanolu R*. Roztokem se nechá pomalu probublávat *dusík R* a postupně se přidá 15,0 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* a zaznamená se potenciometrická titrační křivka *(2.2.20)*. Jestliže křivka vykazuje dva inflexní body, není spotřeba odměrného roztoku mezi těmito body větší než 2,0 ml.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

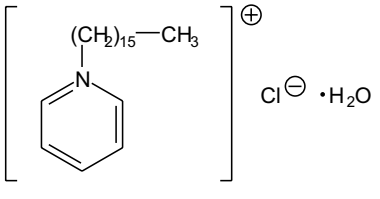
Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 25 ml *chloroformu R*, 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l). Směs se protřepe, chloroformová vrstva se oddělí a odstraní se. Vodná vrstva se protřepe třikrát s 10 ml *chloroformu R* a chloroformová vrstva se vždy odstraní. Potom se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, nechá se ochladit a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS* do vymizení tmavě hnědého zbarvení. Přidají se 2 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za silného protřepávání, dokud se barva chloroformové vrstvy dále nemění. Provede se slepá zkouška za použití směsi 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l), 20 ml *vody R* a 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 33,64 mg $C_{17}H_{38}BrN$.

Cetylpyridinii chloridum

Cetylpyridiniumchlorid



$C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$ M_r 358,01 CAS 6004-24-6

Je to monohydrát 1-hexadecylpyridiniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{38}ClN$.

Vlastnosti

Bílý prášek, slabě mýdlový na dotek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru. Vodné roztoky při třepání silně pění.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 240 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 259 nm a dvě prodlevy při asi 254 nm a při asi 265 nm. Specifická absorbance v maximu je 126 až 134, počítáno na bezvodou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *cetylpyridiniumchloridu CRL*. Měří se látky v pevném stavu.

C. K 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se přidá 0,1 ml *modři bromfenolové RS*, 5 ml *chloroformu R* a protřepe se; chloroformová vrstva je bezbarvá. Přidá se 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, a protřepe se; chloroformová vrstva se zbarví modře.

D. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se použije nejvýše 2,5 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Aminy a aminové soli. 5,0 g se rozpustí zahřátím ve 20 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a *methanolu R* (3 + 97) a přidá se 100 ml *2-propanolu R*. Roztokem se nechá pomalu probublávat *dusík R* a postupně se přidává 12,0 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* a zaznamenává se potenciometrická titrační křivka *(2.2.20)*. Jestliže křivka vykazuje dva inflexní body, není spotřeba odměrného roztoku mezi těmito body větší než 5,0 ml. Jestliže křivka nevykazuje inflexní bod, zkoušená látka nevyhovuje zkoušce. Jestliže křivka vykazuje jeden inflexní bod, zkouška se opakuje s tím, že před titrací se přidají 3,0 ml roztoku *dimethyltetradecylaminu R* (25 g/l) v *2-propanolu R*. Pokud titrační křivka vykazuje jen jeden inflexní bod i po tomto přidání, látka nevyhovuje zkoušce.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,5 % až 5,5 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 25 ml *chloroformu R*, 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l). Směs se protřepe, chloroformová vrstva se oddělí a odstraní se. Vodná vrstva se protřepe třikrát s 10 ml *chloroformu R* a chloroformová vrstva se vždy odstraní. Potom se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, nechá se ochladit a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS* do vymizení tmavě hnědého zbarvení. Přidají se 2 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za silného protřepávání, dokud se barva chloroformové vrstvy dále nemění. Provede se slepá zkouška za použití směsi 10,0 ml čerstvě připraveného roztoku *jodidu draselného R* (50 g/l), 20 ml *vody R* a 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R*.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 34,0 mg $C_{21}H_{38}ClN$.

Chamomillae romanae flos

Květ heřmánku římského

Synonyma. Flos chamomillae romanae, Anthodium chamomillae romanae

Je to usušený úbor plnokvětých kulturních odrůd druhu *Chamaemelum nobile* (L.)ALL. (*Anthemis nobilis* L.). Obsahuje nejméně 7 ml silice v 1 kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga výrazného, charakteristického pachu. Úbory bílé až nažloutle šedé, polokulovité, jednotlivé. Na kuželovitém, plném lůžku jednotlivé květy, každý s průsvitnou plevinou.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Úbory o průměru 8 mm až 20 mm; květní lůžko plné; bazální část květního lůžka kryta zákrovem tvořeným dvěma nebo třemi řadami silných, střechovitě se kryjících kališních lístků s kožovitými okraji. Většina květů jazykovitých, ve střední části úboru několik světle žlutých, trubkovitých květů. Jazykovité květy matně bílé, kopinaté, semeník spodní, tmavě hnědý; čnělka nitkatá, blizna dvoulaločná; trubkovité květy mají pěticípou korunu, pět srostlých, zákorunních tyčinek; gyneceum stejné jako u jazykovitých květů.

B. Úbor se rozdělí na jednotlivé části. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Všechny části úboru s četnými, malými, žlutě se lesknoucími žláznatými chlupy. Zákrovní lístky a pleviny mají pokožkové buňky uspořádané v podélných řadách; buňky na bázi ztlustlé, kryté kuželovitými chlupy asi 500 μm dlouhými. Chlupy tvořeny třemi až čtyřmi velmi krátkými, bazálními buňkami a dlouhou, ohnutou, koncovou buňkou asi 20 μm širokou. Koruna jazykovitých květů z papilózních buněk se zvrásněnou kutikulou. Semeníky obou druhů na bázi s jednořadým prstencem ztlustlých buněk. Květní lůžko a semeníky obsahují malé drúzy šťavelanu vápenatého. Pylová zrna o průměru asi 35 μm, kulovitá, trojhranná, se třemi klíčními pory a ostnitou exinou.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (710) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 2,5 mg *apigeninu R* a 2,5 mg *apigenin-7-glukosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (17 + 17 + 66) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min při 100 °C až 105 °C, ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* (asi 10 ml pro desku 200 mm x 200 mm) a pak stejným objemem roztoku *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R.* Po 30 min se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v horní třetině skvrna se žlutozelenou fluorescencí (apigenin) a ve střední části skvrna s nažloutlou fluorescencí (apigenin-7-glukosid). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a fluorescencí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku

(apigenin a apigenin-7-glukosid); nad skvrnou apigenin-7-glukosidu je skvrna s nahnědlou fluorescencí (luteolin); těsně pod skvrnou apigenin-7-glukosidu je skvrna s lehce nahnědlou fluorescencí (apiin); těsně pod skvrnou apiinu je skvrna s jasně modrou fluorescencí a pod ní opět skvrna s jasně modrou fluorescencí; na chromatogramu mohou být i další méně výrazné skvrny.

Zkoušky na čistotu

Průměr úborů. Nejvýše 3 % úborů o průměru menším než 8 mm.

Znehodnocené úbory. Nejsou přítomny hnědé nebo ztmavlé úbory.

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 20,0 g nerozdrobněné drogy.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 8,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 20,0 g nerozdrobněné drogy se destiluje 3 h rychlostí 3 ml/min až 3,5 ml/min v 500ml baňce se 250 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

† Chlorali hydras

Chloralhydrát

Synonymum. Chloralum hydratum

$Cl_3C - CH(OH)_2$

$C_2H_3Cl_3O_2$ M_r 165,40 CAS 302-17-0

Je to 2,2,2-trichlor-1,1-ethandiol. Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_2H_3Cl_3O_2$.

Vlastnosti

Bezbarvé průsvitné krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se smíchá s 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* směs se zakalí a při zahřátí je cítit chloroform.

B. K 1 ml roztoku S se přidají 2 ml *sulfidu sodného RS*; vznikne žluté zbarvení, které rychle přechází na červenohnědé. Po krátkém stání může vzniknout červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 5,5; měří se roztok S.

Chloralalkoholát. 1,0 g se zahřívá s 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, zfiltruje se a po kapkách se přidává *jod 0,05 mol/l RS* do vzniku žlutého zbarvení. Potom se nechá 1 h stát; nevznikne žádná sraženina.

Chloridy (*2.4.4*). 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8*). 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Netěkavé látky. 2,00 g se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek váží nejvýše 2 mg (0,1 %).

Stanovení obsahu

4,000 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 40,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a nechá se 2 min stát. Po přidání 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru se titruje *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS*. Zneutralizovaný roztok se za použití 0,2 ml *chromanu draselného RS* jako indikátoru titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS*. Spotřeba *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* v ml se vypočítá tak, že se od množství hydroxidu sodného použitého na počátku odečte spotřeba *kyseliny sírové 0,5 mol/l VS* v ml z první části titrace, ke které se připočítají dvě patnáctiny spotřeby *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* zjištěné při druhé části titrace.

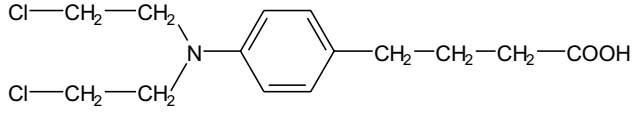
1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 0,1654 g $C_2H_3Cl_3O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Chlorambucilum

Chlorambucil



$C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$ M_r 304,22 CAS 305-03-3

Je to kyselina 4-{4-[bis(2-chlorethyl)amino]fenyl}máselná.
Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*) je 64 °C až 67 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorambucilu CRL.*

C. K 0,4 g se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, promíchá se a nechá 30 min stát za občasného protřepání. Zfiltruje se a sraženina se promyje dvakrát 10 ml *vody R*, které se přidají k filtrátu. K 10 ml filtrátu spojeného s promývací tekutinou se přidá 0,5 ml *tetrajodortuťnatanu draselného RS*; vznikne světle hnědá sraženina. K dalším 10 ml spojeného filtrátu s promývací tekutinou se přidá 0,2 ml *manganistanu draselného RS*; ten se okamžitě odbarví.

D. 50 mg se rozpustí v 5 ml *acetonu R* a zředí *vodou R* na 10 ml. Přidá se 0,05 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,2 ml *dusičnanu stříbrného RS2*; ihned po přidání nevznikne žádná opalescence. Roztok se zahřeje na vodní lázni; vzniká opalescence.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Všechny operace se provádějí co nejrychleji, za ochrany před světlem. Roztoky se připraví v čas potřeby.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *toluenu R, methanolu R, heptanu R* a *2-butanonu R* (40 + 25 + 20 + 20) po dráze 10 cm. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 10 ml *acetonu R* a přidá se 10 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,42 mg $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$.

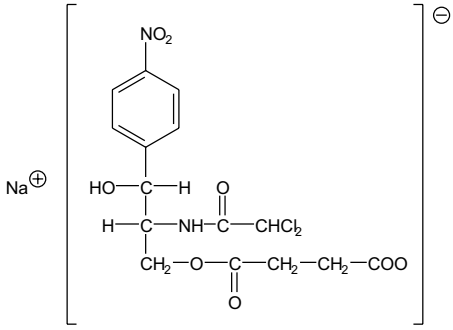
Uchovávání

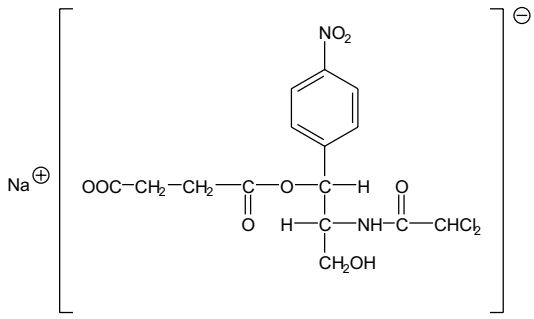
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Chloramphenicoli natrii succinas

Sodná sůl chloramfenikolsukcinatu

Synonyma. Chloramphenicolum succinicum natricum, chloramfenikoljantaran sodný





$C_{15}H_{15}Cl_2N_2NaO_8$ M_r 445,19 CAS 982-57-0

Je to směs s proměnlivým poměrem sodné soli [(2*R*,3*R*)-2-(2, 2-dichloracetamido)-3-hydroxy-3--(4-nitrofenyl)propyl]hydrogensukcinatu a sodné soli [(1*R*,2*R*)-2-(2,2-dichloracetamido)-3-hydroxy-1-(4-nitrofenyl)propyl]hydrogensukcinatu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{15}H_{15}Cl_2N_2NaO_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutobílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *chloramfenikoljantaranu sodného CRL* se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *chloramfenikolu CRL* se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 14 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě hlavní skvrny, které svou polohou a velikostí odpovídají skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Jejich polohy se liší od polohy hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

B. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *lihu R* 50% *(V/V)* přidají se 3 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (10 g/l) a 50 mg *zinku práškového R* a zahřívá se 10 min na vodní lázni. Horký roztok se zfiltruje a ochladí. Přidá se 0,1 ml *benzoylchloridu R* a 1 min se třepe. Poté se přidá 0,5 ml *chloridu železitého RS1* a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se. Horní vrstva je světle fialově červená až purpurová.

C. 50 mg se rozpustí v 1 ml *pyridinu R*. Přidá se 0,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 1,5 ml *vody R*. Zahřívá se 3 min na vodní lázni; vzniká červené zbarvení. Přidají se 2 ml *kyseliny dusičné R* a ochladí se pod tekoucí vodou. Přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l RS;* pomalu vzniká bílá sraženina.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,4 až 7,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +5,0° až +8,0°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 10,0 ml.

Chloramfenikol a chloramfenikoldijantaran disodný. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *chloramfenikolu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml *(roztok a')*. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *chloramfenikoldijantaranu disodného CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml *(roztok b')*. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg zkoušené látky se rozpustí v mobilní fázi, přidá se 5 ml roztoku (a') a 5 ml roztoku (b') a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné R* (20 g/l), *methanolu R* a *vody R* (5 + 40 + 55), s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 275 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 µl.

Nastříkne se zkoušený roztok a všechny porovnávací roztoky. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dva píky odpovídající píkům na chromatogramech (a) a (b) zřetelně odděleny od píků odpovídajících dvěma hlavním píkům na chromatogramu zkoušeného roztoku. Podle potřeby se upraví obsah methanolu v mobilní fázi.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího chloramfenikolu větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %); plocha píku odpovídajícího chloramfenoldijantaranu disodnému není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %; provede se s 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 2,5 ml roztoku zkoušené látky (2 mg/ml) ve *vodě na injekci R.*

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 276 nm.

Vypočítá se obsah $C_{15}H_{15}Cl_2N_2NaO_8$; specifická absorbance je 220.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech chráněna před světlem.

Separandum.

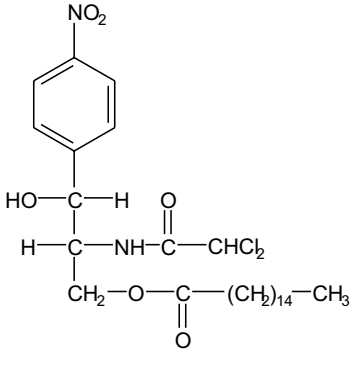
Označování

V označení na vnitřním a vnějším obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

† Chloramphenicoli palmitas

Chloramfenikolpalmitat

Synonymum. Chloramphenicolum palmiticum



$C_{27}H_{42}Cl_2N_2O_6$ M_r 561,54 CAS 530-43-8

Je to [(2*R*,3*R*)-2-(2,2-dichloracetamido)-3-hydroxy-3-(4-nitrofenyl)propyl]palmitat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{27}H_{42}Cl_2N_2O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný mastný prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v etheru, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v hexanu.

Teplota tání je 87 °C až 95 °C.

Je polymorfní. Termodynamicky stabilní forma má po orálním podání jen malou biologickou dostupnost.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi 1 ml roztoku *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 5 ml *acetonu R* a nechá se 30 min stát. Poté se přidá 1,1 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 3 ml *acetonu R*.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *chloramfenikolu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *kyseliny palmitové R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok (c). 10 mg zkoušené látky se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 4 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů roztoku *octanu amonného R* (100 g/l) a *lihu 96% R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem obsahujícím roztok *dichlorfluoresceinu R* (0,2 g/l) a roztok *rhodamin B R* (0,1 g/l) v *lihu 96% R*. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři skvrny, které mají shodnou polohu s hlavními skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (a), (b) a (c).

B. 0,2 g se rozpustí ve 2 ml *pyridinu R*. Přidají se 2 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (100 g/l) a zahřeje se na vodní lázni; vznikne červené zbarvení.

C. 10 mg se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a přidá se 4,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 50 mg *zinku práškového R* a nechá se 10 min stát. Případná usazenina se odstraní dekantací nebo filtrací. Roztok se ochladí v ledové vodě, přidá se 0,5 ml *dusitanu sodného RS* a nechá se 2 min stát. Pak se přidá 1 g *močoviny R*, 2 ml roztoku *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 1 ml *2-naftolu RS*; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 1,0 g se rozpustí zahřátím na 35 °C v 5 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *etheru R*. K roztoku se přidá 0,2 ml *fenolftaleinu RS*. Ke vzniku růžového zbarvení trvajícího nejméně 30 s se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +22,5° až +25,5°. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Volný chloramfenikol. Nejvýše 450 μg/g; 1,0 g se za mírného zahřátí rozpustí v 80 ml *xylenu R*. Po ochlazení se roztok třikrát protřepe s 15 ml *vody R*. Spojené vodné výtřepky se zředí *vodou R* na 50 ml. K tomuto roztoku se přidá 10 ml *toluenu R* a protřepe se. Toluenová vrstva se po oddělení vrstev odstraní. Část vodné vrstvy se odstředí a změří se její absorbance (A) (*2.2.25*) v maximu při 278 nm proti kontrolnímu roztoku získanému při slepé zkoušce, jehož absorbance není větší než 0,05.

Obsah volného chloramfenikolu v mikrogramech na gram se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \,.\, 10^4}{5,96},$$

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF 254 R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *izomerního chloramfenikolpalmitatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *chloramfenikoldipalmitatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *chloramfenikolu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou žádné skvrny izomerního chloramfenikolpalmitatu a chloramfenikoldipalmitatu intenzivnější než skvrny na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b) (2,0 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn izomeru chloramfenikolpalmitatu a chloramfenikoldipalmitatu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h za tlaku nepřevyšujícího 0,1 kPa nad *oxidem fosforečným R* při teplotě 80 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

90,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 250,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 271 nm.

Vypočítá se obsah $C_{27}H_{42}Cl_2N_2O_6$; specifický absorpční koeficient je 178.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

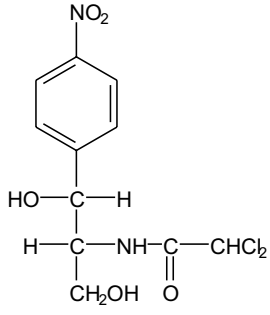
Nečistoty

A. (1*R*,2*R*)-2-(2,2-dichloracetamido)-3-hydroxy-1-(4-nitrofenyl)propylpalmitat (izomer chloramfenikolpalmitatu),

B. chloramfenikoldipalmitat.

† Chloramphenicolum

Chloramfenikol



$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ M_r 323,13 CAS 56-75-7

Je to 2,2-dichlor-N-[(1*R*,2*R*)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(4-nitrofenyl)ethyl]acetamid, produkovaný určitými kmeny mikroorganismu *Streptomyces venezuelae* ve vhodné půdě. Je připravován převážně synteticky. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$.

Vlastnosti

Bílý, našedlý nebo nažloutlý jemný krystalický prášek nebo jemné krystalky, jehličky nebo protáhlé destičky. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v propylenglykolu, těžce rozpustný v etheru.

Roztok látky v lihu 96% je pravotočivý a roztok látky v ethylacetatu je levotočivý.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*) je 149 °C až 153 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *chloramfenikolu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (1 µl) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *lihu R* 50% *(V/V)*, přidají se 3 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (10 g/l) a 50 mg *zinku práškového R* a zahřívá se 10 min na vodní lázni. Horký roztok se zfiltruje a nechá zchladnout. Přidá se 0,1 ml *benzoylchloridu R* a 1 min se třepe. Poté se přidá 0,5 ml *chloridu železitého RS1* a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se. Vodná vrstva se zbarví slabě fialovočerveně až purpurově.

E. K 50 mg v porcelánovém kelímku se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R.* Zahřívá se 10 min na otevřeném plameni, poté se nechá zchladnout, zbytek se rozpustí v 5 ml *kyseliny*

dusičné zředěné RS a zfiltruje se. K 1 ml tohoto filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 0,1 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, protřepe se a přidá se 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +18,5° až +20,5°. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,50 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *chloramfenikolu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 1 µl a 20 µl zkoušeného roztoku, 1 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (20 µl) není, kromě hlavní skvrny, žádná skvrna intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Chloridy (*2.4.4*). K 1,00 g se přidá 20 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny dusičné R* a 5 min se třepe. Zfiltruje se přes papírový filtr, který byl předtím promýván dávkami po 5 ml *vody R* tak dlouho, až 5 ml filtrátu neopalizovalo po přidání 0,1 ml *kyseliny dusičné R* a 0,1 ml *dusičnanu stříbrného RS1*. 15 ml tohoto filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních nebo oftalmologických přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 2,5 ml roztoku, který v 1 ml obsahuje 2 mg zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 278 nm.

Vypočítá se obsah $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$; specifický absorpční koeficient je 297.

Uchovávání

Chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

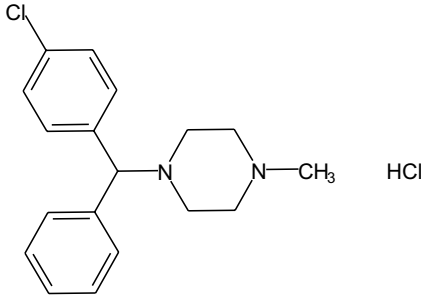
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

† Chlorcyclizini hydrochloridum

Chlorcykliziniumchlorid



$C_{18}H_{22}Cl_2N_2$ M_r 337,29 CAS 14 362-31-3

Je to *(RS)*-1-(4-chlorbenzhydryl)-4-methylpiperaziniumchlorid.
Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{22}Cl_2N_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* (5 g/l) a zředí se tímto roztokem na 100,0 ml. 10,0 ml roztoku se zředí roztokem *kyseliny sírové R* (0,5 g/l) na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 215 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 231 nm. Specifická absorbance v maximu je 475 až 525, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *chlorcykliziniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 6,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,10 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *chlorcykliziniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *methylpiperazinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 25 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *hydroxyziniumchloridu CRL* a 10 mg *chlorcykliziniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 13 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pak se vystaví na 10 min působení par jodu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) skvrna odpovídající methylpiperazinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající methylpiperazinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 130 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

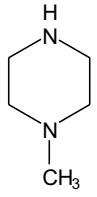
0,200 g se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 50 ml *methanolu R*. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma infexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,73 mg $C_{18}H_{22}Cl_2N_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

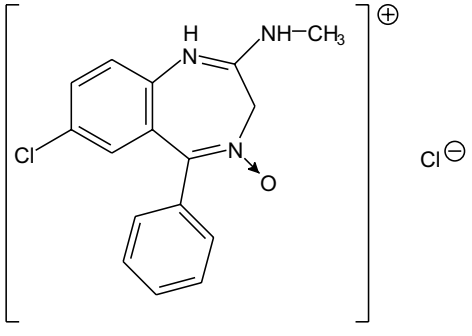
Nečistoty



A. N-methylpiperazin.

§ Chlordiazepoxidi hydrochloridum

Chlordiazepoxidiumchlorid



$C_{16}H_{15}Cl_2N_3O$ M_r 336,22 CAS 438-41-5

Je to 5-fenyl-7-chlor-2-methylamino-3*H*-1,4-benzodiazepinium-4-oxid-chlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{15}Cl_2N_3O$.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 216 °C za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. *Roztoky se připraví za ochrany před světlem a v čas potřeby.*

10,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 200,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se

absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 320 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima: při 246 nm a 309 nm. Specifická absorbance v maximu při 246 nm je 996 až 1058 a v maximu při 309 nm je 280 až 298.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *chlordiazepoxidiumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 20 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R* a 5 min se vaří. Po ochlazení se přidají 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l). Po 1 min se přidá 1 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (5 g/l) a promíchá se. Po 1 min se přidá 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l); vznikne fialově červené zbarvení.

E. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *amoniaku zředěného RS1*, promíchá a po 5 min zfiltruje. Filtrát se okyselí *kyselinou dusičnou zředěnou RS*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují v čas potřeby.* Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *methanolu R* (3 + 97) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *aminochlorbenzofenonu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *chlordiazepoxidiumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *methanolu R* (3 + 97) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se na start nanese jako první bod 5 μl porovnávacího roztoku (a), jako druhý bod pětkrát 5 μl zkoušeného roztoku (a), přičemž se po nanesení každých 5 μl nechá odpařit rozpouštědlo. Jako třetí bod se nanese 5 μl porovnávacího roztoku (c), jako čtvrtý bod se nanese 5 μl zkoušeného roztoku (b) a jako pátý bod se nanese 5 μl porovnávacího roztoku (b). Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 14 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *dusitanu sodného R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* (asi 10 ml), vysuší se proudem studeného vzduchu a postříká se roztokem *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (4 g/l) v *lihu 96% R*. Žádná fialová skvrna odpovídající aminochlorbenzofenonu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 80 ml *kyseliny octové bezvodé R*, ochladí se, přidá se 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,62 mg $C_{16}H_{15}Cl_2N_3O$.

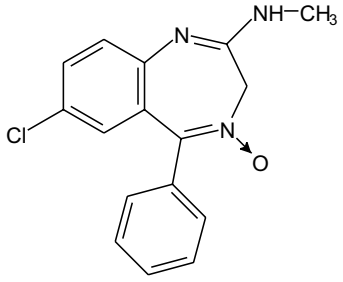
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

§ Chlordiazepoxidum

Chlordiazepoxid



$C_{16}H_{14}ClN_3O$ M_r 299,76 CAS 58-25-3

Je to 5-fenyl-7-chlor-2-methylamino-3*H*-1,4-benzodiazepin-4-oxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{14}ClN_3O$.

Vlastnosti

Téměř bílý nebo slabě žlutý, krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.

Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)* je 240 °C až 244 °C.

B. *Roztoky se připraví za ochrany před světlem a v čas potřeby.*

10,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 200,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 320 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima; při 246 nm a 308 nm. Specifická absorbance v maximu při 246 nm je 1120 až 1190 a v maximu při 308 nm je 316 až 336.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *chlordiazepoxidu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

E. Asi 20 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R* a 5 min se vaří. Po ochlazení se přidají 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l). Po 1 min se přidá 1 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (5 g/l) a promíchá se. Po 1 min se přidá 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l); vznikne červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují v čas potřeby.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (8 + 12) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.

Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (8 + 12) na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 5 mg *aminochlorbenzofenonu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (8 + 12) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.

Porovnávací roztok (b). 20 mg *chlordiazepoxidu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (8 + 12) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (c). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *toluenu R* a *methanolu R* (8 + 12) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 5 μl porovnávacího roztoku (a), 5 μl porovnávacího roztoku (b), 5 μl porovnávacího roztoku (c) a 5 μl zkoušeného roztoku (b). Jako pátý bod se nanese pětkrát 5 μl zkoušeného roztoku (a), přičemž se po nanesení každých 5 μl nechá odpařit rozpouštědlo. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *diethylaminu R*, *lihu 96% R*, *ethylacetatu R* a *toluenu R* (1 + 4 + 10 + 15 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *dusitanu sodného R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* (asi 10 ml), vysuší se proudem studeného vzduchu a postříká se roztokem *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (4 g/l) v *lihu 96% R*. Žádná fialová skvrna odpovídající aminochlorbenzofenonu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 80 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,98 mg $C_{16}H_{14}ClN_3O$.

Uchovávání

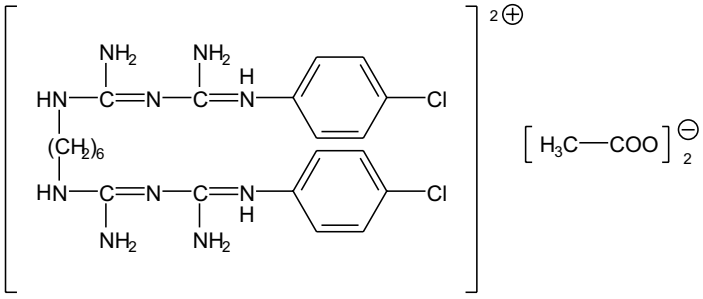
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

Chlorhexidini diacetas

Chlorhexidiniumdiacetat

Synonymum. Chlorhexidini acetas



$C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$ M_r 625,56 CAS 56-95-1

Je to 1,1′-hexamethylen-bis[5-(4-chlorfenyl)biguanidinium]diacetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý mikrokrystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v glycerolu a v propylenglykolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.

Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorhexidiniumdiacetatu CRL.*

B. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml teplého roztoku *cetrimidu R* (10 g/l), přidá se 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 1 ml *bromové vody RS*; vznikne tmavě červené zbarvení.

C. 0,3 g se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*, přidá se 40 ml *vody R*, v případě potřeby se zfiltruje a ochladí se ve vodě s ledem. Potom se přidává po kapkách za stálého míchání *hydroxid sodný koncentrovaný RS* do alkalické reakce za použití *papíru se žlutí titanovou R* a stejného hydroxidu se přidá nadbytek 1 ml. Vzniklá sraženina se odfiltruje a promývá *vodou R* tak dlouho, až filtrát nereaguje zásaditě. Sraženina se překrystalizuje z *lihu R* 70% (*V/V*) a vysuší se při 100 C až 105 °C; taje *(2.2.14)* při 132 °C až 136 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na octany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Chloranilin. Nejvýše 500 μg/g. 0,20 g se rozpustí ve 25 ml *vody R*, je-li třeba, třepe se, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* na 30 ml. Rychle se přidá a po každém přidání promíchá: 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 0,35 ml *dusitanu sodného RS*, 2 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (50 g/l), 5 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1,0 g/l), 1 ml *lihu 96% R*, zředí se *vodou R* na 50,0 ml a nechá se 30 min stát; červenavě modré zbarvení tohoto roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 10,0 ml roztoku *chloranilinu R* (0,010 g/l) v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* místo roztoku zkoušené látky.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,200 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 15 mg *chlorhexidinu pro test způsobilosti CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí mobilní fází na 10 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,2 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok 2,0 g *oktansulfonanu sodného R* ve směsi 270 ml *vody R*, 730 ml *methanolu R* a 120 ml *kyseliny octové ledové R*, s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se promývá mobilní fází do ustavení rovnováhy nejméně 1 h. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) po nastříknutí 10 μl nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogram je shodný se vzorovým chromatogramem *chlorhexidinu pro test způsobilosti CRL* u píků náležejících nečistotě A a nečistotě B, které předcházejí píku chlorhexidinu. Je-li třeba, upraví se koncentrace kyseliny octové v mobilní fázi (zvýšením koncentrace se snižují retenční časy).

Nastříkne se odděleně po 10 μl zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) a zaznamenají se chromatogramy porovnávacího roztoku (b), porovnávacího roztoku (c), až když byl pík chlorhexidinu eluován, zaznamená se chromatogram zkoušeného roztoku po dobu šestinásobku retenčního času píku chlorhexidinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na

chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %). Nepřihlíží se k píkům s relativním retenčním časem 0,25 nebo menším, vztaženo k hlavnímu píku, a k píkům s plochou menší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

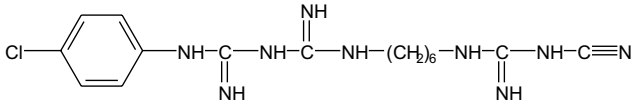
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,15 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

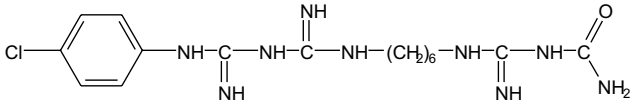
0,140 g se rozpustí ve 100 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,64 mg $C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$.

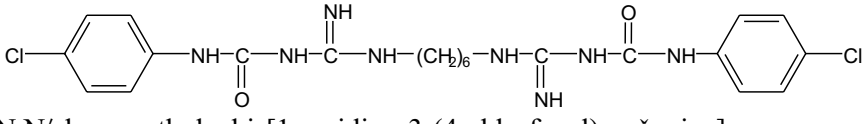
Nečistoty



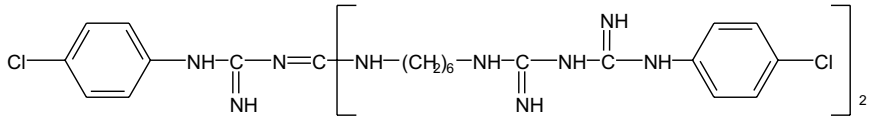
A. 1-(4-chlorfenyl)-5-[6-(3-kyanguanidino)hexyl]biguanid,



B. 1-[N-[6-[5-(4-chlorfenyl)biguanidino]hexyl]amidino]močovina,



C. N,N′-hexamethylenbis[1-amidino-3-(4-chlorfenyl)močovina],

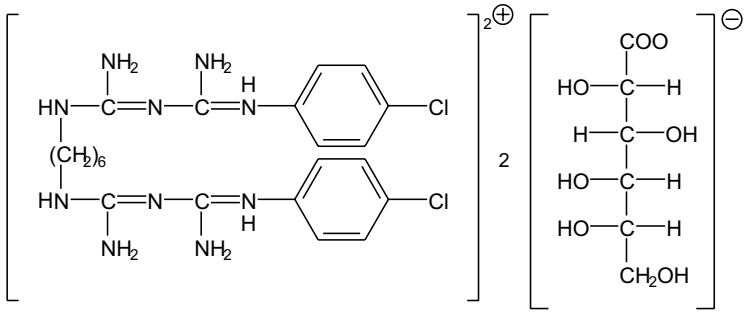


D. 5,5′-bis-(4-chlorfenyl)-1,1′-[6,6′-[[[(4-chlorfenylamino)(imino)methyl]imino]methylendiamino]dihexamethylen]di(biguanid).

Chlorhexidini digluconatis solutio

Roztok chlorhexidiniumdiglukonatu

Synonymum. Chlorhexidini gluconati solutio



$C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$ M_r 897,77

Je to vodný roztok, který obsahuje 190 g/l až 210 g/l 1,1'-hexamethylen-bis[5-(4--chlorfenyl)biguanidinium]-bis(D-glukonatu).

Vlastnosti

Téměř bezbarvá nebo slabě nažloutlá tekutina. Je mísitelný s vodou, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. K 1 ml se přidá 40 ml *vody R* a ochladí se ve vodě s ledem. Potom se přidává po kapkách za stálého míchání *hydroxid sodný koncentrovaný RS* do alkalické reakce za použití *papíru se žlutí titanovou R* a stejného hydroxidu se přidá nadbytek 1 ml. Vzniklá sraženina se odfiltruje a promývá se *vodou R* tak dlouho, až filtrát nereaguje zásaditě. Sraženina se překrystalizuje z *lihu R* 70% (*V/V*) a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zbytku se shoduje se spektrem *chlorhexidinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10,0 ml se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *kalciumdiglutonatu CRL* se rozpustí v 1 ml *vody R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R, amoniaku 26% R*, *vody R* a *lihu 96% R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 20 min při 100 °C a po ochlazení se postříká roztokem *dichromanu draselného R* (50 g/l) ve a 40% roztoku *kyseliny sírové R*. Po 5 min je na chromatogramu zkoušeného roztoku patrná hlavní skvrna shodná polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K 1 ml se přidá 40 ml *vody R* a ochladí se ve vodě s ledem. Potom se přidává po kapkách za stálého míchání *hydroxid sodný koncentrovaný RS* do alkalické reakce za použití *papíru se žlutí titanovou R* a stejného hydroxidu se přidá nadbytek 1 ml. Vzniklá sraženina se odfiltruje a promývá vodou tak dlouho, až filtrát nereaguje zásaditě. Sraženina se překrystalizuje z *lihu R 70% (V/V)* a vysuší se při 100 °C až 105 °C; taje *(2.2.14)* při 132 °C až 136 °C.

D. K 0,05 ml se přidá 5 ml roztoku *cetrimidu R* (10 g/l), 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 1 ml *bromové vody RS*; vznikne tmavě červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,06 až 1,07.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 7,0; měří se roztok připravený zředěním 5,0 ml *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml.

Chloranilin. 2,0 ml se zředí *vodou R* na 100 ml, k 10 ml tohoto roztoku se přidá 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. Rychle se přidá a po každém přidání promíchá: 0,35 ml *dusitanu sodného RS*, 2 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (50 g/l), 5 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l), 1 ml *lihu 96% R*, zředí se *vodou R* na 50,0 ml a nechá se 30 min stát; červenavě modré zbarvení tohoto roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 10,0 ml roztoku *chloranilinu R* (0,010 g/l) v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a 10 ml *vody R* místo zředěného zkoušeného roztoku (0,25 %, vztaženo na chlorhexidiniumdiglukonat při nominální koncentraci 200 g/l).

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 5,0 ml se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15 mg *chlorhexidinu pro test způsobilosti CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 3,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí mobilní fází na 50 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,2 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok 2 g *oktansulfonanu sodného R* ve směsi 270 ml *vody R*, 730 ml *methanolu R* a 120 ml *kyseliny octové ledové R*, s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se promývá mobilní fází do ustavení rovnováhy nejméně 1 h. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) po nastříknutí 10 μl nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku nelze hodnotit, není-li chromatogram shodný se vzorovým chromatogramem *chlorhexidinu pro test způsobilosti CRL,* u něhož píky náležející nečistotě A a nečistotě B předcházejí píku chlorhexidinu. Je-li třeba, upraví se koncentrace kyseliny octové v mobilní fázi (zvýšením koncentrace se snižují retenční časy).

Nastříkne se odděleně po 10 μl zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) a zaznamenají se chromatogramy porovnávacího roztoku (b), porovnávacího roztoku (c), až když byl pík chlorhexidinu eluován, zaznamenává se chromatogram zkoušeného roztoku po dobu šestinásobku retenčního času píku chlorhexidinu. Na chromatogramu zkoušeného

roztoku není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům s relativním retenčním časem 0,25 nebo menším, vztaženo k hlavnímu píku, a k píkům s plochou menší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Stanovení obsahu

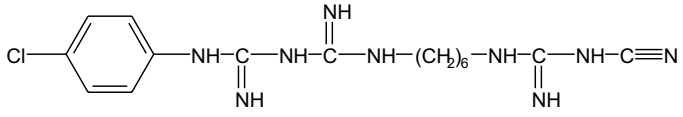
1,000 g se přenese do kádinky na 250 ml, přidá se 50 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Pro výpočet se použije zjištěná hodnota relativní hustoty, viz Zkoušky na čistotu.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,44 mg $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$.

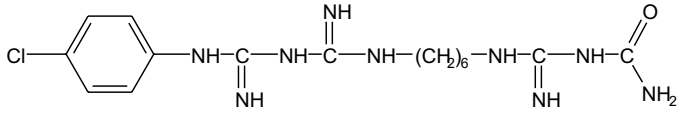
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

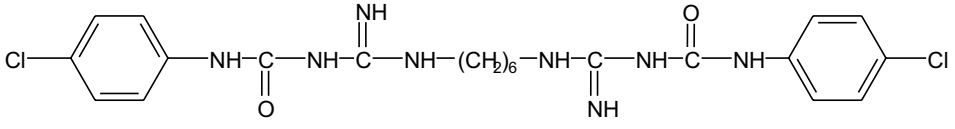
Nečistoty



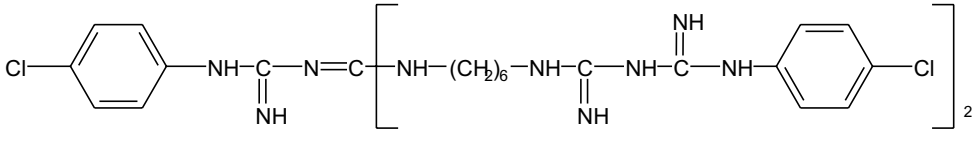
A. 1-(4-chlorfenyl)-5-[6-(3-kyanguanidino)hexyl]biguanid,



B. 1-[N-[6-[5-(4-chlorfenyl)biguanidino]hexyl]amidino]močovina,



C. N,N′-hexamethylenbis[1-amidino-3-(4-chlorfenyl)močovina],

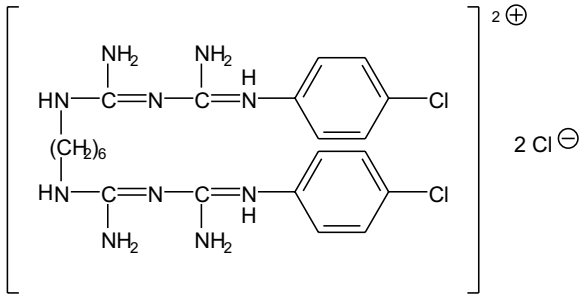


D. 5,5′-bis-(4-chlorfenyl)-1,1′-[6,6′-[[[(4-chlorfenylamino)(imino)methyl]imino] methylendiamino]dihexamethylen]di(biguanid).

Chlorhexidini dihydrochloridum

Chlorhexidiniumdichlorid

Synonymum. Chlorhexidini hydrochloridum



$C_{22}H_{32}Cl_4N_{10}$ M_r 578,37 CAS 3697-42-5

Je to 1,1′-hexamethylen-bis[5-(4-chlorfenyl)biguanidinium]dichlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{32}Cl_4N_{10}$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a v propylenglykolu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorhexidiniumdichloridu CRL.*

B. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml teplého roztoku *cetrimidu R* (10 g/l), přidá se 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 1 ml *bromové vody RS;* vznikne tmavě červené zbarvení.

C. 0,3 g se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*, přidá se 40 ml *vody R*, v případě potřeby se zfiltruje a ochladí se ve vodě s ledem. Potom se přidává po kapkách za stálého míchání *hydroxid sodný koncentrovaný RS* do alkalické reakce za použití *papíru se žlutí titanovou R* a stejného hydroxidu se přidá nadbytek 1 ml. Vzniklá sraženina se odfiltruje a promývá *vodou R* tak dlouho, až filtrát nereaguje zásaditě. Sraženina se překrystalizuje z *lihu R* 70% (*V/V*) a vysuší se při 100 °C až 105 °C; taje *(2.2.14)* při 132 °C až 136 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Chloranilin. Nejvýše 500 μg/g. 0,20 g se disperguje ve 25 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 30 ml. Rychle se přidá a po každém přidání promíchá: 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 0,35 ml *dusitanu sodného RS*, 2 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (50 g/l), 5 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1,0 g/l), 1 ml *lihu 96% R*, zředí se *vodou R* na 50,0 ml a nechá se 30 min stát; červenavě modré zbarvení tohoto roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 10,0 ml roztoku *chloranilinu R* (0,010 g/l) v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* místo roztoku zkoušené látky.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,200 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 15 mg *chlorhexidinu pro test způsobilosti CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí mobilní fází na 10 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,2 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok 2,0 g *oktansulfonanu sodného R* ve směsi 270 ml *vody R*, 730 ml *methanolu R* a 120 ml *kyseliny octové ledové R*, s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se promývá mobilní fází do ustavení rovnováhy nejméně 1 h. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) po nastříknutí 10 μl nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku nelze hodnotit, není-li chromatogram shodný se vzorovým chromatogramem *chlorhexidinu pro test způsobilosti CRL* u píků náležejících nečistotě A a nečistotě B, které předcházejí píku chlorhexidinu. Je-li třeba, upraví se koncentrace kyseliny octové v mobilní fázi (zvýšením koncentrace se snižují retenční časy).

Nastříkne se odděleně po 10 μl zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) a zaznamenají se chromatogramy porovnávacího roztoku (b), porovnávacího roztoku (c), až když byl pík chlorhexidinu eluován, zaznamená se chromatogram zkoušeného roztoku po dobu šestinásobku retenčního času píku chlorhexidinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %). Nepřihlíží se k píkům s relativním retenčním časem 0,25 nebo menším, vztaženo k hlavnímu píku, a k píkům s plochou menší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

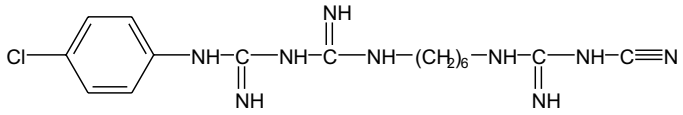
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

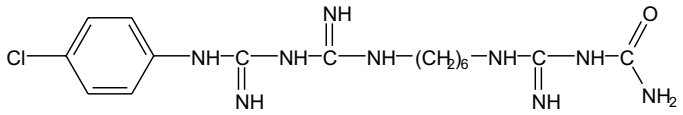
0,130 g se suspenduje ve 100 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 6 ml *octanu rtuťnatého RS* a míchá se do vyjasnění roztoku. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,46 mg $C_{22}H_{32}Cl_4N_{10}$.

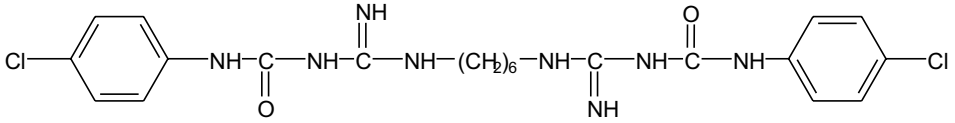
Nečistoty



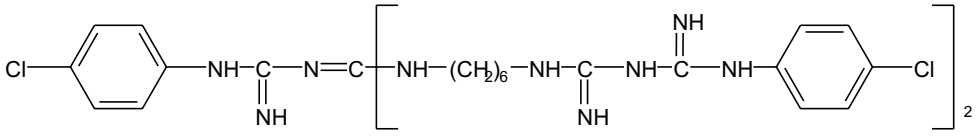
A. 1-(4-chlorfenyl)-5-[6-(3-kyanguanidino)hexyl]biguanid,



B. 1-[N-[6-[5-(4-chlorfenyl)biguanidino]hexyl]amidino]močovina,



C. N,N′-hexamethylenbis[1-amidino-3-(4-chlorfenyl)močovina],

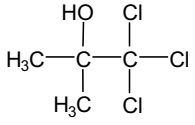


D. 5,5′-bis-(4-chlorfenyl)-1,1′-[6,6′-[[[(4-chlorfenylamino)(imino)methyl]imino] methylendiamino]dihexamethylen]di(biguanid).

† Chlorobutanolum

Chlorbutanol

Synonymum. Chlorbutanolum anhydricum



$C_4H_7Cl_3O$ M_r 177,46 CAS 57-15-8

Je to 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanol. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_7Cl_3O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, snadno sublimující. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustný v glycerolu 85%.

Taje při asi 95 °C, stanoví se bez předchozího sušení.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 20 mg se přidá ke směsi 1 ml *pyridinu R* a 2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, zahřeje se ve vodní lázni, protřepe a nechá se stát; pyridinová vrstva se zbarví červeně.

B. Asi 20 mg se přidá k 5 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a slabě se zahřeje; vznikne černá sraženina.

C. K asi 20 mg se přidají 3 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a třepe se do rozpuštění. Potom se přidá 5 ml *vody R* a pomalu 2 ml *jodu RS*; je cítit uvolňující se jodoform a vznikne nažloutlá sraženina.

D. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. Ke 4 ml roztoku S se přidá 15 ml *lihu 96% R* a 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Chloridy *(2.4.4)*. 0,17 g se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (300 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml *vody R* místo 5 ml *lihu 96% R.*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R*, přidá se 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, zahřívá se 5 min na vodní lázni a ochladí se. Přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R* a silně se třepe. Potom se přidají 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku oranžového zbarvení.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,92 mg $C_4H_7Cl_3O$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě 8 °C až 15 °C.

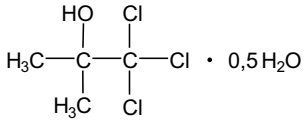
Separandum.

---

† Chlorobutanolum hemihydricum

Chlorbutanol hemihydrát

Synonyma. Chlorbutanolum, chlorbutanol



$C_4H_7Cl_3O$. $0,5H_2O$ M_r 186,47 CAS 6001-64-5

Je to hemihydrát 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanolu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_7Cl_3O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, snadno sublimující. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustný v glycerolu 85%.

Taje při asi 78 °C, stanoví se bez předchozího sušení.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 20 mg se přidá ke směsi 1 ml *pyridinu R* a 2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, zahřeje se ve vodní lázni, protřepe se a nechá se stát; pyridinová vrstva se zbarví červeně.

B. Asi 20 mg se přidá k 5 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a slabě se zahřeje; vznikne černá sraženina.

C. K asi 20 mg se přidají 3 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a třepe se do rozpuštění. Potom se přidá 5 ml *vody R* a pomalu 2 ml *jodu RS;* je cítit uvolňující se jodoform a vznikne nažloutlá sraženina.

D. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. Ke 4 ml roztoku S se přidá 15 ml *lihu 96% R* a 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Chloridy *(2.4.4)*. K 1 ml roztoku S se přidají 4 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml *vody R* místo 5 ml *lihu 96% R*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,5 % až 5,5 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R*, přidá se 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, zahřívá se 5 min ve vodní lázni a ochladí se. Přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R* a silně se třepe. Potom se přidají 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku oranžového zbarvení.

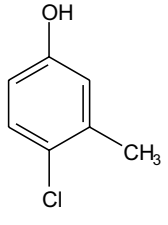
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,92 mg $C_4H_7Cl_3O$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě 8 °C až 15 °C.
Separandum.

† Chlorocresolum

Chlorkresol



C_7H_7ClO M_r 142,58 CAS 59-50-7

Je to 4-chlor-3-methylfenol. Obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny C_7H_7ClO.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé až téměř bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru a v mastných olejích. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 64 °C až 67 °C.

B. K 0,1 g se přidá 0,2 ml *benzoylchloridu R* a 0,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Roztok se důkladně protřepává do vzniku bílé krystalické sraženiny. Potom se přidá 5 ml *vody R* a zfiltruje se. Sraženina se překrystalizuje z 5 ml *methanolu R* a usuší se při 70 °C; taje *(2.2.14)* při 85 °C až 88 °C.

C. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne namodralé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 3,0 g se jemně upráškují, 2 min se protřepávají s 60 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a směs se zfiltruje.

Vzhled roztoku. 1,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Roztok je oranžový nebo červený. Ke změně zbarvení na čistě žluté se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,80 m a vnitřního průměru 3 mm až 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % až 5 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro plynovou chromatografii R* s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 125 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 210 °C, teplota detektoru na 230 °C.

Zaznamenává se chromatogram po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času (asi 8 min) píku odpovídajícího chlorkresolu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě plochy píku odpovídajícího chlorkresolu, není větší než 1 % celkové plochy všech píků. Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Netěkavé látky. 2,0 g se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek vysušený při 100 °C až 105 °C váží nejvýše 2 mg (0,1 %).

Stanovení obsahu

V kuželové baňce se zabroušenou zátkou se rozpustí 70,0 mg v 30 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 25,0 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS*, 20 ml roztoku *bromidu draselného R* (150 g/l) a 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Roztok se nechá 15 min stát chráněn před světlem. Po přidání 1,0 g *jodidu draselného R* a 100 ml *vody R* se titruje za intenzivního promíchávání

thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS. Před koncem titrace se přidá 1 ml *škrobu RS* jako indikátor. Provede se slepá zkouška.

1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* odpovídá 3,565 mg C_7H_7ClO.

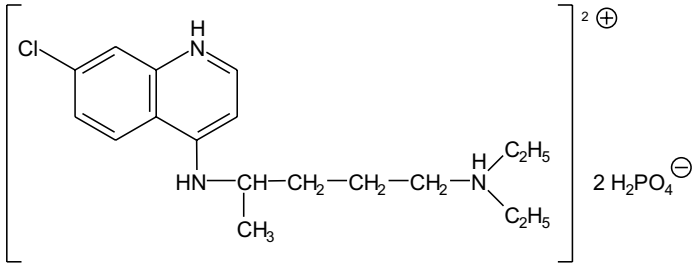
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Chloroquini diphosphas

Chlorochiniumdifosfat

Synonyma. Chloroquini phosphas, dihydrogenfosforečnan chlorochinia



$C_{18}H_{32}ClN_3O_8P_2$ M_r 515,87 CAS 50-63-5

Je to (*RS*)-7-chlor-4-(4-diethylamonio-1-methylbutylamino)chinoliniumbis(dihydrogenfosfat). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{32}ClN_3O_8P_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, v etheru a v methanolu.

Vyskytuje se ve dvou formách, z nichž jedna taje při asi 195 °C a druhá při asi 218 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 210 nm až 370 nm; roztok vykazuje maxima při 220 nm, 235 nm, 256 nm, 329 nm a 342 nm. Specifická absorbance v maximu při 220 nm je 600 až 660, při 235 nm je 350 až 390, při 256 nm je 300 až 330, při 329 nm je 325 až 355 a při 342 nm je 360 až 390.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* izolované báze zkoušené látky se shoduje se spektrem izolované báze *chlorochiniumsulfatu CRL*. Zaznamenají se spektra roztoků připravených takto: rozpustí se jednotlivě 0,1 g zkoušené látky a 80 mg referenční látky v 10 ml *vody R*, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a vytřepe se dvakrát 20 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové vrstvy se spojí, promyjí *vodou R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, odpaří do sucha a zbytky se rozpustí odděleně každý ve 2 ml *chloroformu R*.

C. 25 mg se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 8 ml *trinitrofenolu RS1*. Vzniklá sraženina se promyje *vodou R*, *lihem 96% R* a nakonec *etherem R;* taje *(2.2.14)* při 206 °C až 209 °C.

D. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a protřepe se dvakrát 20 ml *chloroformu R*. Vodná vrstva se okyselí *kyselinou dusičnou R;* tento roztok vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,8 až 4,3; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *cyklohexanu R* a *chloroformu R* (10 + 40 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Přidá se 5 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se se 40 ml *etheru R*. Vodná vrstva se zfiltruje a filtrát se zneutralizuje *kyselinou octovou ledovou R*. Roztok se zahřívá na vodní lázni do odstranění etheru, po ochlazení se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

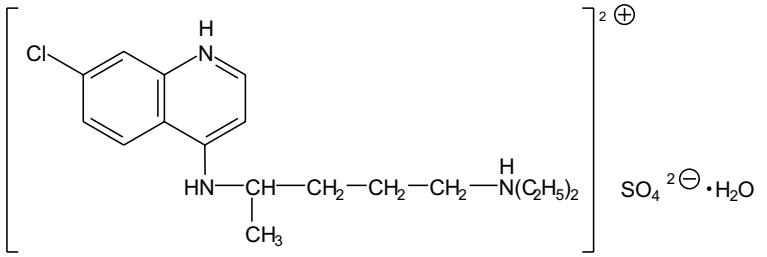
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,79 mg $C_{18}H_{32}ClN_3O_8P_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Chloroquini sulfas

Chlorochiniumsulfat



$C_{18}H_{28}ClN_3O_4S \cdot H_2O$ M_r 435,97 CAS 6823-83-2

M_r bezvodého 417,95

Je to monohydrát (*RS*)-7-chlor-4-(4-diethylamonio-1-methylbutylamino)chinoliniumsulfatu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{28}ClN_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 208 °C (okamžitá metoda).

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 210 nm až 370 nm; roztok vykazuje maxima při 220 nm, 235 nm, 256 nm, 329 nm a 342 nm. Specifická absorbance v maximu při 220 nm je 730 až 810; při 235 nm je 430 až 470; při 256 nm je 370 až 410, při 329 nm je 400 až 440 a při 342 nm je 430 až 470.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* izolované báze zkoušené látky se shoduje se spektrem izolované báze *chlorochiniumsulfatu CRL*. Zaznamenají se spektra roztoků, připravených takto: rozpustí se jednotlivě 0,1 g zkoušené látky a referenční látky v 10 ml *vody R*, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a vytřepe se dvakrát 20 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové vrstvy se spojí, promyjí *vodou R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, odpaří do sucha a zbytky se rozpustí odděleně každý ve 2 ml *chloroformu R*.

C. 25 mg se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 8 ml *trinitrofenolu RS1*. Vzniklá sraženina se promyje *vodou R*, *lihem 96% R* a nakonec *etherem R*; taje *(2.2.14)* při 206 °C až 209 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *cyklohexanu R* a *chloroformu R* (10 + 40 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Přidá se 5 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se se 40 ml *etheru R*. Vodná vrstva se zfiltruje a filtrát se neutralizuje *kyselinou octovou ledovou R*. Roztok se zahřívá na vodní lázni do odstranění etheru, po ochlazení se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 3,0 až 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

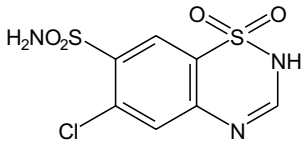
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,8 mg $C_{18}H_{28}ClN_3O_4S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Chlorothiazidum

Chlorothiazid



$C_7H_6ClN_3O_4S_2$ M_r 295,72 CAS 58-94-6

Je to 6-chlor-7-sulfamoyl-2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_7H_6ClN_3O_4S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu a těžce rozpustný v lihu 96%. Je rozpustný ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 80,0 mg se rozpustí ve 100 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 220 nm až 320 nm. Absorpční maxima jsou při 225 nm a 292 nm, prodleva je při asi 310 nm. Specifická absorbance jednotlivých maxim je 725 až 800 a 425 až 455.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorothiazidu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy silikagelu GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *chlorothiazidu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se *ethylacetatem R* po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K 0,1 g se přidá granule *hydroxidu sodného R* a silně se zahřeje. Vyvíjející se plyn zbarví *papír lakmusový červený R* modře. Po ochlazení se přidá k zůstatku 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Vyvíjející se plyn zbarví *papír s octanem olovnatým R* černě.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 1,0 g upráškované zkoušené látky se přidá 50 ml *vody R*, 2 min se třepe a zfiltruje se.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* a 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *2-propanolu R* a *ethylacetatu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel (asi 10 min) a postříká se směsí stejných dílů *kyseliny sírové v lihu RS* a *lihu 96% R* za použití 10 ml směsi na desku o rozměru 200 mm x 200 mm. Stříká se po malých dávkách a rozpouštědlo se nechá vždy odpařit, aby nedošlo k nadměrnému zvlhčení vrstvy. Vrstva se zahřívá 30 min při teplotě 100 °C až 105 °C a potom se deska umístí opatrně nad 10 ml nasyceného roztoku *dusitanu sodného R* ve skleněné nádobě tak, aby se roztok nedotýkal vrstvy. K roztoku dusitanu sodného se opatrně přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a uzavřená nádoba se nechá 15 min stát. Deska se nechá 15 min v sušárně s větráním při 40 °C a potom se postříká třemi dávkami, každá po 5 ml, čerstvě připraveného roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l) v *lihu 96% R.* Vrstva se pozoruje v procházejícím světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (160 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova* (10 μg Pb/ml).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 50 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*, který je v bodě první inflexe.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,57 mg $C_7H_6ClN_3O_4S_2$.

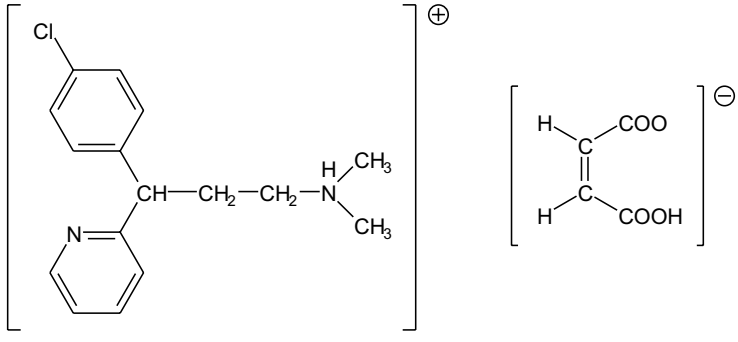
Uchovávání

Separandum.

† Chlorphenamini hydrogenomaleas

Chlorfenaminiumhydrogenmaleinat

Synonymum. Chlorphenamini maleas



$C_{20}H_{23}ClN_2O_4$ M_r 390,87 CAS 113-92-8

Je to (*RS*)-[3-(4-chlorfenyl)-3-(2-pyridyl)propyl]dimethylamoniumhydrogenmaleinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{23}ClN_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 132 °C až 135 °C.

B. 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje maximum při 265 nm. Specifická absorbance v maximu je 200 až 220.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorfenaminiumhydrogenmaleinatu CRL*.

D. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a za třepání se po kapkách přidá 25 ml *trinitrofenolu RS*. Sraženina se odfiltruje přes filtr ze slinutého skla, promyje se 3 ml *lihu 96% R*, překrystalizuje ze směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C; sraženina taje *(2.2.14)* při 196 °C až 200 °C.

E. Asi 0,2 g se rozpustí ve 3 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a protřepe se třikrát 5 ml *etheru R*. K 0,1 ml vodné vrstvy se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; roztok je bezbarvý. Ke zbytku vodné vrstvy se přidají 2 ml *bromu RS,* směs se zahřívá 15 min ve vodní lázni, pak se zahřeje k varu

a ochladí. K 0,2 ml tohoto roztoku se přidá 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; vzniká modré zabarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok HŽ $_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem R* na 50 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí na 10 ml stejným rozpouštědlem.

Na vrstvu se nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R, chloroformu R* a *cyklohexanu R* (10 + 40 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %). Nepřihlíží se ke skvrnám na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 25 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,54 mg $C_{20}H_{23}ClN_2O_4$.

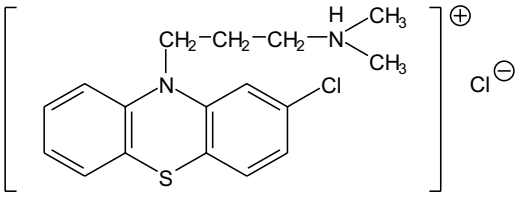
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Chlorpromazini hydrochloridum

Chlorpromaziniumchlorid

Synonymum. Chlorpromazinium chloratum



$C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$ M_r 355,32 CAS 69-09-0

Je to [3-(2-chlor-10-fenothiazinyl)propyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Na světle a vzduchu je nestálý.

Taje při asi 196 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. *Roztok se připraví za ochrany před přímým světlem a absorbance se změří ihned po přípravě.* 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 500,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 340 nm; roztok vykazuje maxima při 254 nm a 306 nm. Specifická absorbance v maximu při 254 nm je 890 až 960.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorpromaziniumchloridu CRL*. Měří se spektra roztoků látek (60 g/l) v *dichlormethanu R* za použití 0,1mm kyvety.

C. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.3)*.

D. Vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 4,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za ochrany před světlem.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Připraví se v čas potřeby.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 200 ml.

Na vrstvu se nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R, diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrnám na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* se odečte mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,53 mg sloučeniny $C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$.

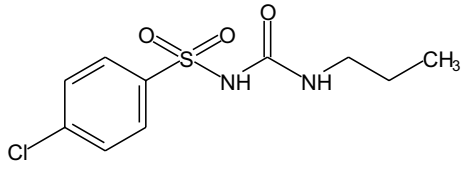
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

---

† Chlorpropamidum

Chlorpropamid



$C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$ M_r 276,74 CAS 94-20-2

Je to 1-(4-chlorfenylsulfonyl)-3-propylmočovina. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, dobře rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 126 °C až 130 °C.

B. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. 10,0 ml získaného roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm. Absorpční maximum roztoku je při 232 nm. Specifická absorbance v maximu je 570 až 630.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *chlorpropamidu CRL*. Pokud jsou spektra získaná se vzorky v tuhém stavu rozdílná, rozpustí se odděleně zkoušená i referenční látka v *dichlormethanu R*, odpaří se do sucha a se získanými zbytky se znovu zaznamenají spektra.

D. 0,1 g se zahřívá 10 min se 2 g *uhličitanu sodného bezvodého R* do vzniku matně červeného zbarvení. Po ochlazení se zbytek extrahuje asi 5 ml *vody R*, zředí se *vodou R* na 10 ml a zfiltruje se. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 15 mg *4-chlorbenzensulfonamidu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 15 mg *1,3-dipropylmočoviny CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,3 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 5 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *acetonem R* na 15 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, cyklohexanu R, methanolu R* a *dichlormethanu R* (11,5 + 30 + 50 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pak se zahřívá 10 min při 110 °C. Na dno komory se vloží odpařovací miska obsahující směs objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R*, *vody R* a roztoku *manganistanu draselného R* (50 g/l) (1 + 1 + 2) a komora se na 15 min uzavře. Suchá horká vrstva se vloží na 2 min do komory nasycené parami chloru. Pak se vrstva vyjme a nechá se v proudu studeného vzduchu až do vymizení chloru a tak dlouho, dokud vrstva pod body nanášky reaguje s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS* za vzniku modrého zbarvení. Postříká se *škrobem s jodidem draselným RS.* Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, odpovídající 4-chlorbenzensulfonamidu, nepřevyšuje intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %); skvrna odpovídající 1,3-dipropylmočovině nepřevyšuje intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících 4-chlorbenzensulfonamidu a 1,3-dipropylmočovině, nepřevyšuje intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,3 %) a nejvýše dvě takové skvrny převyšují intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)* 2,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85) a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku (2 μg Pb/ml) se použije základní *roztok olova (100 μg Pb/ml)* zředěný směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného po přidání *fenolftaleinu RS1*, přidá se 25 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* až do vzniku růžového zbarvení.

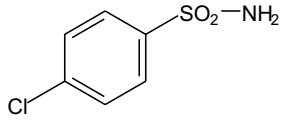
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,67 mg $C_{10}H_{13}ClN_2O_3S$.

Uchovávání

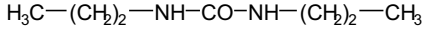
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

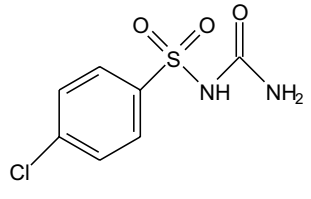
Nečistoty



A. 4-chlorbenzensulfonamid,



B. 1,3-dipropylmočovina,

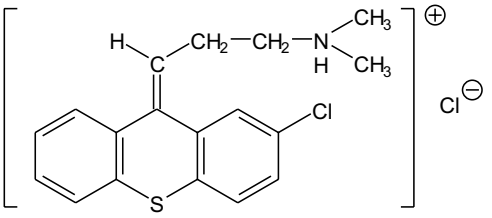


C. [(4-chlorfenyl)sulfonyl]močovina.

† Chlorprothixeni hydrochloridum

Chlorprothixeniumchlorid

Synonymum. Chlorprothixenium chloratum



$C_{18}H_{19}Cl_2NS$ M_r 352,32 CAS 6469-93-8

Je to (*Z*)-[3-(2-chlor-9*H*-thioxanthen-9-yliden)propyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{19}Cl_2NS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný v dichlormethanu a prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 220 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlorprothixeniumchloridu CRL*. Měří se spektra tablet zbytků zkoušené látky a referenční látky připravených takto: 0,25 g se vpraví do dělicí nálevky, rozpustí se v 10 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a protřepe se s 20 ml *etheru R*. Organická vrstva se oddělí a promyje se 5 ml *vody R*. Spojené vodné vrstvy se použijí ke zkoušce totožnosti E. Organická vrstva se odpaří do sucha a zbytek po odpaření se vysuší při 40 °C až 50 °C. Postup se opakuje s 0,25 g *chlorprothixeniumchloridu CRL* a se zbytky se připraví tablety.

B. 0,2 g se rozpustí ve směsi 5 ml dioxanu *R* a 5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1,5 g/l) a pak se přidá 0,8 ml *kyseliny dusičné R*. Po 10 min se tento roztok přidá ke 20 ml *vody R* a po 1 h stání se vzniklá sraženina odfiltruje. Filtrát se ihned použije ke zkoušce totožnosti C. Sraženina se zahřátím rozpustí v asi 15 ml *lihu 96% R* a roztok se přidá k 10 ml *vody R*. Sraženina se opět zfiltruje a suší se 2 h při 100 °C až 105 °C. Sraženina taje *(2.2.14)* při 152 °C až 154 °C.

C. K 1 ml filtrátu ze zkoušky B se přidá 0,2 ml suspenze 50 mg *červeně pravé B R* v 1 ml *lihu 96% R* a 1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l RS;* vznikne tmavě červené zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

D. Asi 20 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné R;* vznikne červené zbarvení. Potom se přidá 5 ml *vody R* a roztok se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm; roztok fluoreskuje zeleně.

E. Vodná vrstva ze zkoušky A se zfiltruje. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,4 až 5,2; měří se roztok S.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *chlorprothixeniumchloridu CRL* obsahujícího 2 % E-izomeru se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 2 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml. 1,5 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *1-propanolu R, toluenu R* a *acetonu R* (2 + 2 + 40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna o R_F vyšším, než má hlavní skvrna, intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2 %) a žádná skvrna o R_F nižším, než má hlavní skvrna, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g látky.

Stanovení obsahu

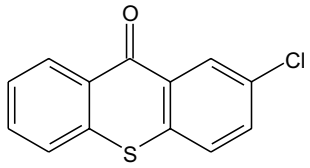
0,300 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* se odečte mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,23 mg sloučeniny $C_{18}H_{19}Cl_2NS$.

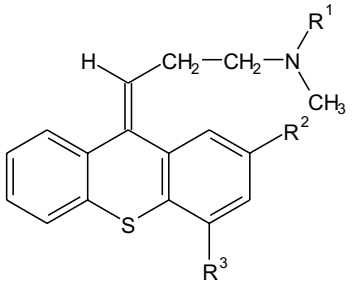
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



A. 2-chlorthioxanthon,



B. $R^1 = CH_3$; $R^2 = Cl$; $R^3 = H$
(*E*)-3-(2-chlor-9*H*-thioxanthen-9-yliden)propyl-N,N-dimethylamin,

C. $R^1 = CH_3$; $R^2 = H$; $R^3 = Cl$;
(*Z*)-3-(4-chlor-9*H*-thioxanthen-9-yliden)propyl-N,N-dimethylamin,

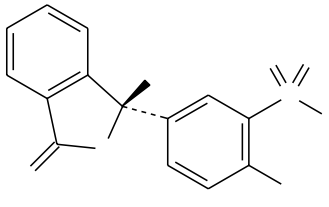
D. $R^1 = H$; $R^2 = Cl$; $R^3 = H$;
(*Z*)-3-(2-chlor-9*H*-thioxanthen-9-yliden)propyl-N-methylamin,

E. $R^1 = CH_3$; $R^2 = H$; $R^3 = H$;
3-(9*H*-thioxanthen-9-yliden)propyl-N,N-dimethylamin.

† Chlortalidonum

1998

Chlortalidon



$C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$ M_r 338,76 CAS 77-36-1

Je to 2-chlor-5-[(1*RS*)-2,3-dihydro-1-hydroxy-3-oxo-1*H*-isoindol-1-yl]benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutobílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 220 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 340 nm. Roztok vykazuje absorpční maxima při 275 nm a 284 nm. Poměr absorbance změřené v maximu při 284 nm k absorbanci změřené v maximu při 275 nm je 0,73 až 0,88.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *chlortalidonu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *chlortalidonu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *chlortalidonu CRL* a 10 mg *hydrochlorothiazidu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *ethylacetatu R* (1,5 + 98,5) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny sírové R;* vzniká intenzivní žluté zbarvení.

E. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je současně zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -0,15° až +0,15°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,20 g v *methanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *hydroxidu sodném zředěném RS* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než stupeň zbarvení 6 porovnávacího roztoku nejpodobnějšího zbarvení *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 1,0 g se zahřátím rozpustí ve směsi 25 ml *acetonu R* a 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a ochladí se. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* je nejvýše 0,75 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). Rozpustí se 20 mg *chlortalidon nečistoty B CRL* a 20 mg *chlortalidonu CRL* ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (1 + 4) na 200 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *toluenu R, xylenu R, amoniaku 26% R*, *dioxanu R* a *2-propanolu R* (5 + 10 + 20 + 30 + 30) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající *chlortalidon nečistotě B* intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající chlortalidon nečistotě B, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jsou-li na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,3 g se rozetřou, přidá se 30 ml *vody R*, 5 min se třepe a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (350 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 10 ml základního *roztoku na chloridy (5 μg Cl/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

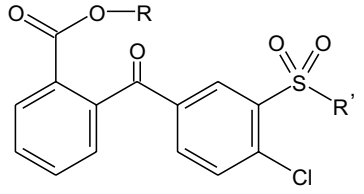
0,200 g se rozpustí v 50 ml *acetonu R* a v atmosféře dusíku se titruje *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,88 mg $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$.

Uchovávání

Separandum.

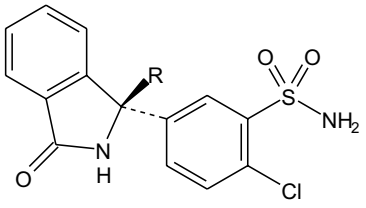
Nečistoty



A. R = H, R′ = OH:
kyselina 2-(4-chlor-3-sulfobenzoyl)benzoová,

B. R = H, R′ = NH_2:
kyselina 2-(4-chlor-3-sulfamoylbenzoyl)benzoová,

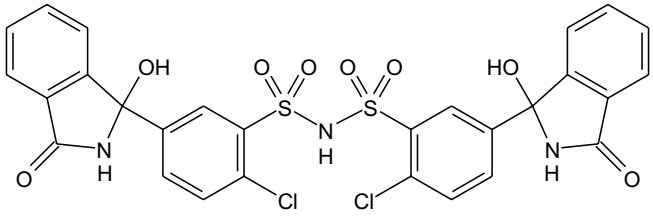
C. R = CH_2-CH_3, R′ = NH_2:
ethyl-[2-(4-chlor-3-sulfamoylbenzoyl)benzoat],



a enantiomer

D. R = O-CH_2-CH_3
2-chlor-5-[(1*RS*)-1-ethoxy-2,3-dihydro-3-oxo-1*H*-isoindol-1-yl]benzensulfonamid,

E. R = H:
2-chlor-5[(1*RS*)-2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-isoindol-1-yl]benzensulfonamid,

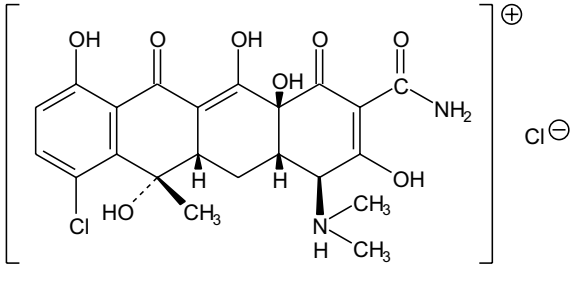


F. bis[2-chlor-5-(2,3-dihydro-1-hydroxy-3-oxo-1*H*-isoindol-1-yl)benzensulfonyl]amin.

† Chlortetracyclini hydrochloridum

Chlortetracykliniumchlorid

Synonymum. Chlortetracyclinium chloratum



$C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_8$ $_r$ 515,35 CAS 64-72-2

Je to (4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-(7-chlor-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-2-karbamoyl-6-methyl-1,11-dioxo-4-naftacenyl)dimethylamoniumchlorid, který je produkován růstem určitých kmenů *Streptomyces aureofaciens* nebo se získává jiným způsobem. Obsah chlortetracykliniumchloridu je nejméně 89,5 % a součet obsahu chlortetracykliniumchloridu a tetracykliniumchloridu je 94,5 % až 100,5 %, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Žlutý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na 8,0 (asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm). Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *chlortetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *chlortetracykliniumchloridu CRL,* 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL* a 5 mg *metacykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vznikne tmavě modré zbarvení, které přechází na modrozelené. Přidá se 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní v hnědavé.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,3 až 3,3; měří se následující roztok: 0,1 g se slabým zahřátím rozpustí v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -235° až -250°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,125 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 0,125 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml. Absorbance měřená při 460 nm není vyšší než 0,40.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu. Nastříknou se zkoušený roztok a porovnávací roztoky (e) a (f). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) je pík hodnotitelný. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího 4-epichlortetracyklinu není větší než plocha píku odpovídajícího 4-epichlortetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (4,0 %). Celková plocha všech píků mezi píkem rozpouštědla a píkem chlortetracyklinu, kromě píku tetracyklinu a 4-epichlortetracyklinu, není větší než 25 % plochy píku 4-epichlortetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (f).

Tetracykliniumchlorid. Nejvýše 8,0 %, počítáno na bezvodou látku; stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se odděleně zkoušený roztok a porovnávací roztok (e).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *chlortetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *4-epichlortetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 10,0 ml porovnávacího roztoku (b) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 5,0 ml porovnávacího roztoku (b) se smíchá s 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (f). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 20,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm nebo 10 μm) a udržované při 35 °C,
- mobilní fáze, která je směsí 50 ml *kyseliny chloristé RS*, 450 ml *dimethylsulfoxidu R* a 500 ml *vody R*, s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl,
- elektronického integrátoru.

Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastaví se citlivost tak, aby výška píku byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (4-epichlortetracyklin) a druhým píkem (chlortetracyklin) je nejméně 2,0. Podle potřeby se přizpůsobí obsah dimethylsulfoxidu v mobilní fázi. Faktor symetrie druhého píku je nejvýše 1,3. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku

pro chlortetracyklin nejvýše 1,0 %. Podle potřeby se nastaví parametry integrátoru. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztok (a).

Obsah chlortetracykliniumchloridu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

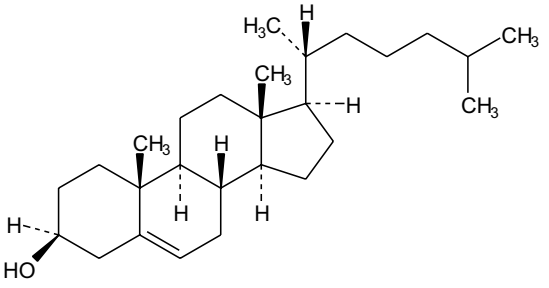
Nečistoty

A. 4-epichlortetracyklin,

B. tetracyklin.

Cholesterolum

Cholesterol



$C_{27}H_{46}O$ M_r 386,66 CAS 57-88-5

Je to 5-cholesten-3β-ol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 95,0 % sloučeniny $C_{27}H_{46}O$ a celkový obsah sterolů je 97,0 % až 103,0 %.

Výroba

Je-li cholesterol získáván z tkání teplokrevných zvířat, např. z hovězího mozku, tuku z vlny nebo jiných materiálů, musí tato zvířata splňovat požadavky oprávněné autority, které se kladou na zvířata určená pro humánní konzumaci, nesmí mít hovězí spongiformní encefalopatii a nesmí být vystavena rizikovým faktorům, jako je krmení ruminantními bílkovinami. K zajištění těchto

požadavků musí být použita zvířata z certifikovaných zdrojů. Při výběru zdroje použité zvířecí tkáně musí být vzata v úvahu její relativní infekčnost, tedy i potenciální rizika.

Různé rizikové kategorie jsou popsány v pravidlech Evropské unie pro zdravotnictví "Guidelines for minimising the risk of transmission agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products" nebo v pravidlech Světové zdravotnické organizace.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%. Je citlivý na světlo.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 147 °C až 150 °C.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *dichlorethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *cholesterolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned za ochrany před světlem směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (33 + 66) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a třikrát se postříká *chloridem antimonitým RS*. Chromatogramy se pozorují 3 min až 4 min po postřiku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Asi 5 mg se rozpustí ve 2 ml *dichlormethanu R*, přidá se 1 ml *acetanhydridu R*, 0,01 ml *kyseliny sírové R* a protřepe se; vznikne růžové zbarvení, které se rychle mění na červené, potom na modré a nakonec na jasně zelené.

Zkoušky na čistotu

Rozpustnost v lihu 96%. 0,5 g se v uzavřené nádobě rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* při 50 °C a nechá se 2 h stát; netvoří se zákal ani usazenina.

Kysele reagující látky. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *etheru R*, přidá se 10,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a asi 1 min se třepe. Směs se opatrně zahřívá do odpaření etheru a 5 min se vaří. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R*, 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se za stálého míchání *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do vymizení růžového zbarvení. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebou *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* potřebnou ke změně zbarvení indikátoru u slepé zkoušky a vlastní titrace není větší než 0,3 ml.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,3 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *pregnenolonisobutyratu CRL* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,100 g *pregnenolonisobutyratu CRL* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 25,0 mg *cholesterolu CRL* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony z křemenného skla délky 30 m a vnitřního průměru 0,53 mm potažené *polydimethylsiloxanem R* (1,5 μm),
- *helia pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 6 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 270 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 280 °C a detektoru na 290 °C.

Nastříkne se odděleně po 0,5 μl každého roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku rozlišení mezi píkem odpovídajícím pregnenolonisobutyratu a píkem odpovídajícím 5-cholesten-3β-olu je nejméně 3,5.

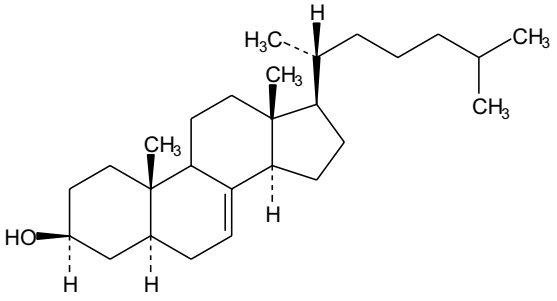
Vypočítá se procentuální obsah 5-cholesten-3β-olu za použití deklarovaného obsahu 5-cholesten--3β-olu v *cholesterolu CRL.*

Vypočítá se procentuální celkový obsah sterolů sečtením obsahu 5-cholesten-3β-olu a látek s retenčním časem stejným nebo menším, než je 1,5násobek retenčního času 5-cholesten-3β-olu. Nepřihlíží se k píku roztoku vnitřního standardu a k píku rozpouštědla.

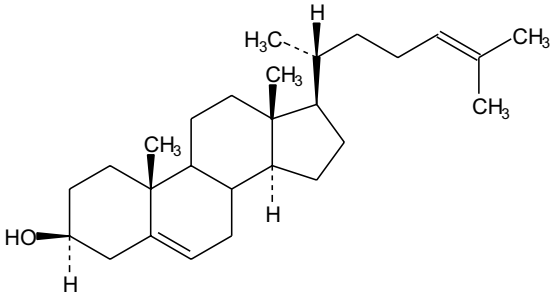
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

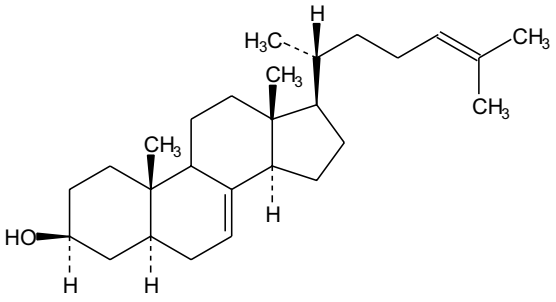
Nečistoty



A. 7-cholesten-3β-ol (lathosterol),



B. 5,24-cholestadien-3β-ol (desmosterol),



C. 7,24-cholestadien-3β-ol.

Chymotrypsinum

Chymotrypsin

CAS 9004-07-3

Je to proteolytický enzym získaný aktivací chymotrypsinogenu extrahovaného z hovězích slinivek (*Bos taurus L.)*. Jeho účinnost je nejméně 5,0 mikrokatalů v miligramu. Nejvyšší účinnost je v roztoku při hodnotě pH asi 8; při hodnotě pH 3 je účinnost reverzibilně snížena, ale látka je nejstabilnější.

Výroba

Vyrábí se za podmínek minimalizujících mikrobiální znečištění.

Vlastnosti

Bílý krystalický nebo amorfní prášek. Je těžce rozpustný ve vodě. Amorfní forma je hygroskopická.

Zkoušky totožnosti

A. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 10 ml. Na bílé kapkovací destičce se smíchá v jamce 0,05 ml tohoto roztoku s 0,2 ml roztoku substrátu; vzniká fialově červené zbarvení.

Roztok substrátu pro zkoušky totožnosti. K 24,0 mg *acetyltyrosinethylesteru R* se přidá 0,2 ml *lihu 96% R* a míchá se až do rozpuštění. Přidají se 2,0 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0 (0,067 mol/l)*, 1 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* a směs se zředí *vodou R* na 10,0 ml.

B. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5 ml. Přidá se 0,10 ml roztoku *tosylfenylalanylchlormethanu R* (20 g/l) v *lihu 96% R*, upraví se pH na hodnotu 7,0 a 2 h se třepe. V jamce bílé kapkovací destičky se smíchá 0,05 ml tohoto roztoku s 0,2 ml roztoku substrátu, viz Zkouška totožnosti A; do 3 min nevznikne žádné zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,10 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 5,0; měří se roztok S.

Absorbance *(2.2.25)*. 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Roztok vykazuje absorpční maximum při 281 nm a minimum při 250 nm. Specifická absorbance v maximu je 18,5 až 22,5 a v minimu není větší než 8.

Trypsin. Do jamky bílé kapkovací destičky se přidá 0,05 ml *tlumivého roztoku trometamolového o pH 8,1* a 0,1 ml roztoku S. Ke směsi se přidá 0,2 ml roztoku substrátu (zkoušený roztok). Současně a za stejných podmínek se připraví porovnávací roztok obsahující zkoušenou látku, ke které byl přidán *trypsin BRP* (nejvýše 10 g/l). Měří se čas; zkoušený roztok se během 3 min až 5 min po přidání roztoku substrátu nezbarví. Porovnávací roztok se zbarví fialově červeně.

Roztok substrátu. K 98,5 mg *tosylargininiummethylesterchloridu R* vhodného pro stanovení trypsinu se přidá 5 ml *tlumivého roztoku trometamolového o pH 8,1* a míchá se do rozpuštění. Potom se přidá 2,5 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

Histamin *(2.6.10)*. Nejvýše 1 µg na 5 mikrokatalů chymotrypsinové účinnosti, počítáno jako histaminová báze. Před stanovením se zkoušený roztok zahřívá 30 min na vodní lázni.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 0,100 g se suší 2 h při 60 °C při tlaku nepřesahujícím 0,7 kPa.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním rychlosti, s jakou hydrolyzuje zkoušená látka *acetyltyrosinethylester R*, s rychlostí, s jakou hydrolyzuje *chymotrypsin BRP* za stejných podmínek stejný substrát.

Přístrojové vybavení. Použije se reakční nádobka o objemu asi 30 ml vybavená:
- zařízením udržujícím teplotu při (25,0 ± 0,1) °C,
- míchadlem, např. elektromagnetickým,
- víkem s otvory pro elektrody, byretu, přívod dusíku a pro přidávání zkoumadel.

Lze použít manuální nebo automatické titrační zařízení. Při manuální titraci se použije byreta dělená po 0,005 ml a pH-metr s dostatečnou citlivostí se skleněnou a kalomelovou elektrodou.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 250,0 ml.

Porovnávací roztok. 25,0 mg *chymotrypsinu BRP* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 250,0 ml.

Roztoky se uchovávají při 0 °C až 5 °C. 1 ml každého roztoku se ohřeje na asi 25 °C a po 15 min se z každého roztoku použije 50 µl (odpovídá asi 25 nanokatalům) k titraci. Titrace se provádí v dusíkové atmosféře. Do reakční nádobky se přidá 10,0 ml roztoku *chloridu vápenatého 0,01 mol/l RS* a za míchání 0,35 ml *acetyltyrosinethylesteru 0,2 mol/l RS*. Když je teplota ustálena na (25,0 ± 0,1) °C (asi po 5 min), upraví se pH přesně na hodnotu 8,0 *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*. Přidá se 50 µl zkoušeného roztoku (odpovídá asi 5 µg zkoušené látky) a měří se stopkami čas. Udržuje se pH na hodnotě 8,0 přidáváním *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* a zaznamenává se objem přidaného roztoku po 30 s. Vypočítá se spotřeba *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* za sekundu mezi 30. s a 210. s. Za stejných podmínek se provede titrace s porovnávacím roztokem a stanoví se spotřeba *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* za sekundu.

Vypočítá se účinnost v mikrokatalech na mg podle vzorce:

$$\frac{m' \,.\, V}{m \,.\, V'} \,.\, A,$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v miligramech,
m' - navážku *chymotrypsinu BRP* v miligramech,
V - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* za sekundu u zkoušeného roztoku,
V' - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* za sekundu u porovnávacího roztoku,
A - účinnost *chymotrypsinu BRP* v mikrokatalech na miligram.

Uchovávání

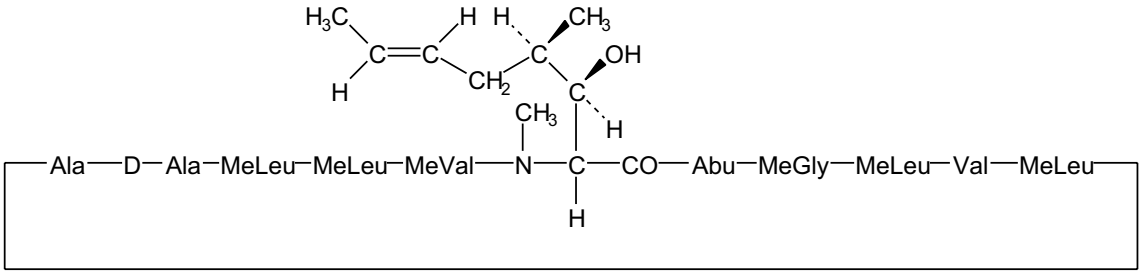
Ve vzduchotěsných obalech při teplotě 2 °C až 8 °C, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- množství chymotrypsinu a celková účinnost v mikrokatalech na balení,
- že amorfní látka je hygroskopická.

† Ciclosporinum

Cyklosporin



$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ M_r 1202,63 CAS 59865-13-3

Je to *cyklo*[[(*E*)-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-oktenoyl]-L-2-aminobutyryl--N-methylglycyl-N-methyl-L-leucyl-L-valyl-N-methyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-N-methyl-L-leucyl--N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-valyl]. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$. Cyklosporin je látka produkovaná mikroorganismem *Beauveria nivea* (= *Tolypocladium inflatum Gams*) nebo se získává jinými způsoby.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *cyklosporinu CRL.*

B. Na chromatogramu zkoušeného roztoku ze zkoušky Stanovení obsahu je retenční čas hlavního píku shodný s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,5 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 15 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $Č_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -185° až -193°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,125 g v *methanolu R* a zředěním *methanolem R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se odděleně zkoušený roztok a porovnávací roztok (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,7násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než 0,7násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,7 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy (*2.4.8*). Zbytek získaný ve zkoušce Ztráta sušením vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší 3 h při 60 °C a při tlaku nepřevyšujícím 15 Pa.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,84 m.j. endotoxinů v miligramu. 50 mg zkoušené látky se rozpustí ve směsi 280 mg *lihu 96% R* a 650 mg *ricinového oleje polyoxyethylenovaného R* a zředí se vodou pro LAL na požadovanou koncentraci.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 30,0 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 30,0 mg *cyklosporinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* na 200 ml.
Porovnávací roztok (c). 3 mg *cyklosporinu U CRL* se rozpustí ve 2,5 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R.* Přidá se 2,5 ml porovnávacího roztoku (a).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 μm až 5 μm); kolona je spojena s dávkovacím zařízením kovovou kapilárou asi 1 m dlouhou o vnitřním průměru 0,25 mm,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny fosforečné R, terc.butylmethyletheru R, acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 50 + 430 + 520) s průtokovou rychlostí asi 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Teplota kolony a kovové kapiláry se udržuje na 80 ° C.

Nastříkne se porovnávací roztok (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je 1,0 až 1,8. Je-li třeba, upraví se poměr terc.butylmethyletheru k acetonitrilu v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, jestliže retenční čas hlavního píku je 25 min až 30 min. Je-li třeba, upraví se poměr acetonitrilu k vodě v mobilní fázi. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Obsah cyklosporinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

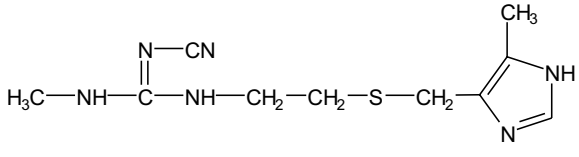
A. cyklosporiny B, C, D, E, G, H, L, T, U, V,

B. dihydrocyklosporin A,

C. isocyklosporin A.

† Cimetidinum

Cimetidin



$C_{10}H_{16}N_6S$ M_r 252,34 CAS 51481-61-9

Je to 2-kyano-1-methyl-3-[2-(5-methylimidazol-4-ylmethylthio)-ethyl]guanidin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{10}H_{16}N_6S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 139 °C až 144 °C; je-li třeba, rozpustí se zkoušená látka v *2-propanolu R*, odpaří se do sucha a stanovení teploty tání se opakuje.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *cimetidinu CRL*. Jestliže se spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *2-propanolu R,* odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

D. Asi 1 mg se rozpustí ve směsi 1 ml *ethanolu R* a 5 ml čerstvě připraveného roztoku *kyseliny citronové R* (20 g/l) v *acetanhydridu R*. Směs se zahřívá 10 min až 15 min na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 3,0 g se rozpustí ve 12 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml. 20 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *cimetidinu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

A. Na vrstvu se odděleně nanese po 4 μl každého roztoku a vrstva se nechá 15 min stát v komoře nasycené parami mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (15 + 20 + 65), a ihned se vyvíjí stejnou směsí po dráze 15 cm.

Vrstva se usuší proudem studeného vzduchu a vystaví se účinku par jodu do získání kontrastních skvrn. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je zřetelně viditelná skvrna.

B. Na vrstvu se odděleně nanese po 4 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (8 + 8 + 84) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší

proudem studeného vzduchu a vystaví se účinku par jodu do získání kontrastních skvrn. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je zřetelně viditelná skvrna.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,23 mg $C_{10}H_{16}N_6S$.

Uchovávání

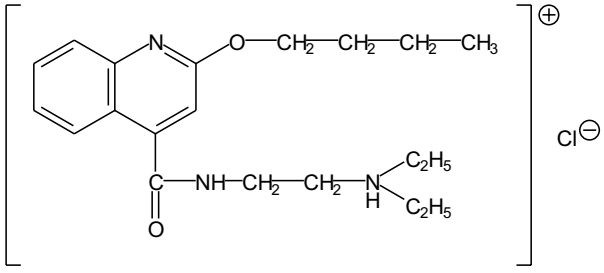
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Cinchocaini hydrochloridum

Cinchokainiumchlorid

Synonymum. Cinchocainium chloratum



$C_{20}H_{30}ClN_3O_2$ M_r 379,93 CAS 61-12-1

Je to 2-{[4-(2-butoxy)chinolyl]karbamoyl}ethyl-N,N-diethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{30}ClN_3O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, hygroskopický. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu. Velmi snadno se sráží.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 60,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 246 nm a při 319 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 246 nm k absorbanci naměřené v maximu při 319 nm je 2,7 až 3,0.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cinchokainiumchloridu CRL*. Tablety se připraví za použití *chloridu draselného R*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *vody R*. Po přidání 1 ml *amoniaku zředěného RS2* vznikne bílá sraženina. Sraženina se zfiltruje, promyje se pětkrát 10 ml *vody R* a vysuší se v exsikátoru. Taje při 64 °C až 66 °C (*2.2.14*).

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,0; měří se roztok připravený zředěním 10 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 50 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *cinchokainiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). 20 mg *benzokainu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. 1 ml tohoto roztoku a 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% R*, *methanolu R*, *acetonu R* a *toluenu R* (1 + 5 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna skvrna je intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %; 0,500 g se suší ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

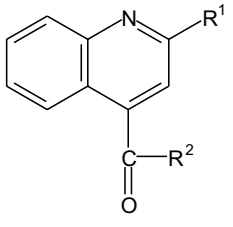
0,300 g se rozpustí ve směsi 15,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence do druhé inflexe. Spotřeba se vypočítá z rozdílu mezi oběma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,99 mg $C_{20}H_{30}ClN_3O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



A. R^1 = Cl; R^2 = $NH(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$: 2-chlor-N-(2-diethylaminoethyl)-4-chinolinkarboxamid,
B. R^1 = OH; R^2 = OH: kyselina 2-hydroxy-4-chinolinkarboxylová,
C. R^1 = OH; R^2 = $NH(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$: 2-hydroxy-N-(2-diethylaminoethyl)-4-chinolin-karboxamid,
D. R^1 = $O(CH_2)_3CH_3$; R^2 = OH: kyselina 2-butoxy-4-chinolinkarboxylová.

Cinchonae cortex

Chinovníková kůra

Synonyma. Cortex chinae, chinová kůra

Je to usušená kůra druhu *Cinchona pubescens* VAHL (*Cinchona succirubra* PAV.) nebo jeho odrůd a kříženců.

Obsahuje nejméně 6,5 % veškerých alkaloidů, z toho nejméně 30 % až 60 % alkaloidů chininového typu.

Vlastnosti

Droga intenzivně hořké, poněkud svíravé chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kůra kmenů a větví je tvořena rourkovitými nebo žlábkovitými, 2 mm až 6 mm silnými kusy. Zevní strana je matná, hnědošedá nebo šedá, na povrchu často s lišejníky. Je obvykle drsná, se zřetelnými příčnými prasklinami, podélně zbrázděná nebo vrásčitá a popraskaná. U některých odrůd je odštěpena primární kůra. Vnitřní strana je rýhovaná, tmavě červenohnědá. Lom je v zevní části krátký, ve vnitřní části vláknitý. Kůra kořene je nepravidelně žlábkovitá, svinutá nebo zkroucená. Na zevní straně je poněkud šupinovitá, na vnitřní straně více nebo méně rýhovaná. Barva na obou stranách je stejná jako u kůry kmene. Lom je vláknitý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: tenkostěnné buňky korku s červenohnědým obsahem; žlutá, vřetenovitě protáhlá lýková vlákna až 90 μm v průměru a až 1300 μm dlouhá, se silně ztlustlými stěnami, nestejným luminem a s nápadnými nálevkovitými tečkami. Parenchymatické idioblasty jsou vyplněny hranolovitými mikrokrystaly šťavelanu vápenatého. Pozoruje se v *glycerolu R* 50% *(V/V)*. Jsou patrna škrobová zrna o průměru 6 μm až 10 μm.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g práškované drogy (180) se ve zkumavce smíchá s 0,1 ml *amoniaku 26% RS* a 5 ml *chloroformu R*. Občas se silně protřepe a po 30 min se zfiltruje. Filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Odparek se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R*.
Porovnávací roztok. 17,5 mg *chininu R*, 0,5 mg *chinidinu R*, 10 mg *cinchoninu R* a 10 mg *cinchonidinu R* se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R*.

Na vrstvu se nanese ve vzdálenosti 2 cm po 1 μl a 2 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *chloroformu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C do vymizení pachu *diethylaminu R* (asi 10 min). Po vychladnutí se postříká *kyselinou mravenčí bezvodou R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrny odpovídající chininu a chinidinu fluoreskují intenzivně modře. Postříká se *zkoumadlem jodoplatičitým R*. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou tři fialové skvrny, které se barví fialově šedě a odpovídají chininu (R_F 0,2 - 0,3), chinidinu (R_F 0,3 - 0,4) a cinchoninu (R_F 0,4 - 0,5); těsně pod skvrnou odpovídající chinidinu je intenzivně tmavě modrá skvrna cinchonidinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny, které svou polohou, zbarvením a intenzitou odpovídají skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanesení stejných objemů.

D. 0,5 g práškované drogy (180) se ve zkumavce opatrně zahřeje nad přímým plamenem. Na stěně zkumavky kondenzují krvavě červené kapky. Po ochlazení se tyto kapky rozpustí v 10 ml *lihu R* 70% (*V/V*). Roztok v ultrafialovém světle při 365 nm fluoreskuje intenzivně modře.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 1,0 %.

Stanovení obsahu

1,000 g práškované drogy (180) se v 250ml kuželové baňce smíchá s 10 ml *vody R* a 7 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Zahřívá se 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 25 ml *chloroformu R*, 50 ml *etheru R* a 5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l). Směs se 30 min protřepává, pak se přidají 3 g práškovaného *tragantu R* a protřepává se, dokud roztok není čirý.

Zfiltruje se chomáčkem vaty a baňka i vata se propláchnou pětkrát 20 ml směsi objemových dílů *chloroformu R* a *etheru R* (1 + 2). Spojené filtráty a promývací tekutiny se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 10,0 ml *ethanolu R*. 5,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Porovnávací roztok chininu. 30,0 mg *chininu R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Porovnávací roztok cinchoninu. 30,0 mg *cinchoninu R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

Změří se absorbance (*2.2.25*) těchto roztoků při 316 nm a 348 nm a obsah alkaloidů v procentech se vypočítá podle vztahu:

$$x = \frac{[A_{316} \cdot A_{348c}] - [A_{316c} \cdot A_{348}]}{[A_{316q} \cdot A_{348c}] - [A_{316c} \cdot A_{348q}]} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{2}{1000},$$

$$y = \frac{[A_{316} \cdot A_{348q}] - [A_{316q} \cdot A_{348}]}{[A_{316c} \cdot A_{348q}] - [A_{316q} \cdot A_{348c}]} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{2}{1000},$$

v němž značí:

m - navážku drogy v gramech,

x - procentuální obsah alkaloidů chininového typu,

y - procentuální obsah alkaloidů cinchoninového typu,

A_{316} - absorbanci zkoušeného roztoku při 316 nm,

A_{348} - absorbanci zkoušeného roztoku při 348 nm,

A_{316c} - absorbanci porovnávacího roztoku cinchoninu při 316 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku),

A_{316q} - absorbanci porovnávacího roztoku chininu při 316 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku),

A_{348c} - absorbanci porovnávacího roztoku cinchoninu při 348 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku),

A_{348q} - absorbanci porovnávacího roztoku chininu při 348 nm (počítáno na koncentraci 1 mg látky v 1000 ml roztoku).

Obsah veškerých alkaloidů ($x + y$) a relativní obsah alkaloidů chininového typu se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{100 \cdot x}{x + y}.$$

Uchovávání

Chráněna před světlem a vlhkostí.

Cinnamomi cortex

Kůra skořicovníku

Je to usušená kůra mladých větví druhu *Cinnamomum ceylanicum* NEES. zbavená zevní vrstvy korku a parenchymu kůry. Obsahuje nejméně 12 ml silice v 1 kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga charakteristického, aromatického pachu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kůra je asi 0,2 mm až 0,8 mm silná, po více kusech stočená do jednoduchých nebo dvojitých rourek. Svrchní strana hladká, žlutohnědá s nevýraznými jizvami po listech a postranních pupenech, s jemným bělavým podélným rýhováním. Vnitřní strana poněkud tmavší, podélně rýhovaná. Lom je krátký, vláknitý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je nažloutlý až červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: skupiny okrouhlých sklereid s tečkovanými, žlábkovitými a mírně ztlustlými stěnami; četná, bezbarvá, jednoduchá vlákna, často celá, s úzkým luminem a se ztlustlými, zdřevnatělými, řídce tečkovanými stěnami; malé krystalky šťavelanu vápenatého. Pozoruje se v *glycerolu R* 50% *(V/V);* práškovaná droga obsahuje četná škrobová zrna. Úlomky korku chybějí nebo jsou patrné jen velmi zřídka.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,1 g práškované drogy (500) se protřepává 15 min se 2 ml *dichlormethanu R.* Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří na vodní lázni téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,4 ml *toluenu R.*
Porovnávací roztok. 50 μl *cinnaldehydu R* a 10 μl *eugenolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se *dichlormethanem R* po dráze 10 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku je ve střední části patrna skvrna odpovídající cinnaldehydu, bezprostředně nad ní skvrna odpovídající eugenolu. Skvrny se označí. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je světle modrá skvrna (*o*-methoxycinnaldehyd), bezprostředně pod ní skvrna odpovídající cinnaldehydu. Vrstva se postříká *floroglucinem RS.* Skvrna odpovídající cinnaldehydu je zbarvena žlutohnědě, skvrna *o*-methoxycinnaldehydu je zbarvena fialově.

Zkoušky na čistotu

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 20,0 g drogy se upráškuje (710) bezprostředně před použitím. Destiluje se 3 h rychlostí 2,5 ml/min až 3,5 ml/min v 500ml baňce s 200 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Cinnarizinum

Cinarizin

1998

$C_{26}H_{28}N_2$ M_r 368,52 CAS 298-57-7

Je to (*E*)-1-(difenylmethyl)-4-(3-fenyl-2-propenyl)piperazin.
Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{26}H_{28}N_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 118 °C až 122 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cinarizinu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu s fluorescenčním indikátorem optimální intenzity při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cinarizinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *cinarizinu CRL* a 10 mg *flunariziniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů roztoku *chloridu sodného R* (1 mol/l), *methanolu R* a *acetonu R* (20 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. 0,2 g *kyseliny citronové bezvodé R* se rozpustí v 10 ml *acetanhydridu R* ve vodní lázni při 80 °C a dále se zahřívá 10 min ve vodní lázni při 80 °C. Přidá se asi 20 mg zkoušené látky; vzniká fialově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo alkalicky reagující látky. 0,5 g se smíchá s 15 ml *vody R,* 2 min se vaří, ochladí se a zfiltruje. Filtrát se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml. K 10 ml roztoku se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je růžový. K dalším 10 ml roztoku se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 12,5 mg *cinarizinu CRL* a 15,0 mg *flunariziniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (3 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,5 ml/min, gradientového programu za použití následujících podmínek:
  - *mobilní fáze A* - roztok *octanu amonného R* (10 g/l),
  - *mobilní fáze B* - roztok 0,2 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* v *acetonitrilu R;*

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 20	75 → 10	25 → 90	lineární gradient
20 - 25	10	90	izokratická eluce
25 - 30	75	25	přechod na počáteční eluční směs
30 = 0	75	25	nové spuštění gradientu

- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Kolona se ustaluje nejméně 30 min počáteční eluční směsí.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu zaznamenaného s 10 µl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. V případě potřeby se upraví koncentrace kyseliny octové ledové v mobilní fázi B k dosažení horizontální základní linie na chromatogramu.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: cinarizinu asi 11 min a flunarizinu asi 11,5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími cinarizinu a flunarizinu je nejméně 5,0. V případě potřeby se upraví časový program gradientové eluce.

Nastříkne se odděleně 10 µl *methanolu R* jako slepá zkouška, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě plochy hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku zaznamenanému při slepé zkoušce a k píkům s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85). Přidává se *kyselina chlorovodíková zředěná RS* až do úplného rozpuštění a zředí se stejnou směsí *vody R* a *acetonu R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 10 ml základního roztoku olova (1 µg Pb/ml), který se připraví zředěním základního *roztoku olova (100 µg Pb/ml)* směsí *vody R* a *acetonu R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 4 h suší ve vakuu při 60 C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R*, přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*.

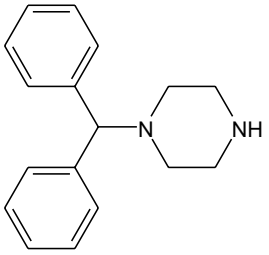
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,43 mg $C_{26}H_{28}N_2$.

Uchovávání

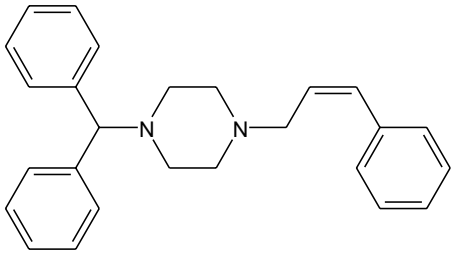
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

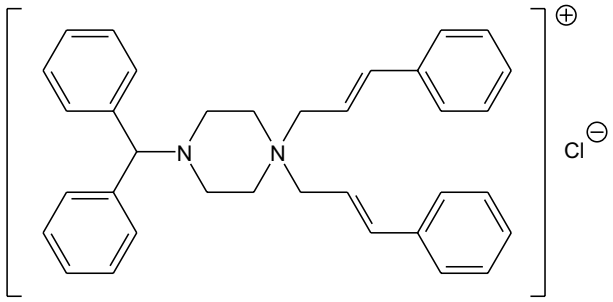
Nečistoty



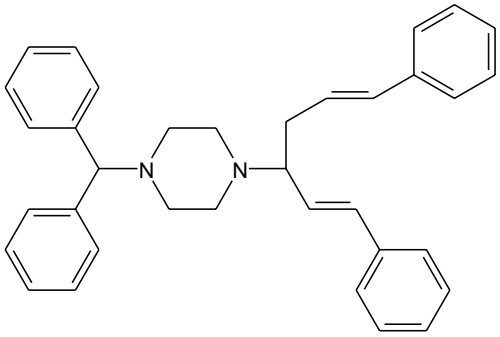
A. 1-(difenylmethyl)piperazin,



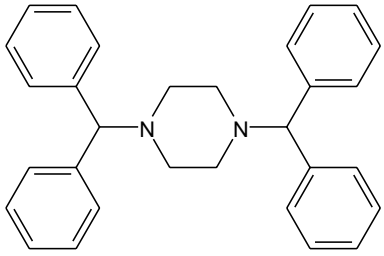
B. (*Z*)-1-difenylmethyl-4-(3-fenyl-2-propenyl)piperazin,



C. (*E*)-1,1-bis(3-fenyl-2-propenyl)-4-(difenylmethyl)piperaziniumchlorid,



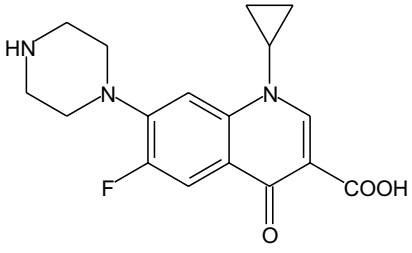
D. (*E*)-1-difenylmethyl-4-{4-fenyl-1-[(*E*)-2-fenylvinyl]-3-butenyl}piperazin,



E. 1,4-bis(difenylmethyl)piperazin.

† Ciprofloxacinum

Ciprofloxacin



$C_{17}H_{18}FN_3O_3$ M_r 331,35 CAS 85721-33-1

Je to kyselina 1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)- 3-chinolinkarboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{17}H_{18}FN_3O_3$.

Vlastnosti

Světle žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v ethanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěné kyselině octové.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ciprofloxacinu CRL*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_4$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kyselina fluorochinolová. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *amoniaku zředěném RS1* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyseliny fluorochinolové CRL* se rozpustí ve směsi složené z 0,1 ml *amoniaku zředěného RS1* a 90 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku. Na dno chromatografické komory se vloží odpařovací miska s 50 ml *amoniaku 26% R*, komora se uzavře a vrstva se vystaví na 15 min působení par amoniaku. Pak se deska vloží do druhé komory a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonitrilu R, amoniaku 26% R, methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající kyselině fluorochinolové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). K 25 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny fosforečné zředěné RS,* zředí se mobilní fází na 50,0 ml a nechá se v ultrazvukové lázni do získání čirého roztoku.

Zkoušený roztok (b). 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *ciprofloxacinu nečistoty B CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. Tento roztok se použije i k přípravě porovnávacího roztoku (d). 1,0 ml roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 2,5 mg *ciprofloxacinu nečistoty C CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. Tento roztok se použije i k přípravě porovnávacího roztoku (d). 1,0 ml roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 2,5 mg *ciprofloxacinu nečistoty D CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. Tento roztok se použije i k přípravě porovnávacího roztoku (d). 1,0 ml roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 0,1 ml zkoušeného roztoku (a), 1,0 ml porovnávacího roztoku (a), 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) a 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) popsaných výše se smíchají a zředí se mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *kyseliny fosforečné 0,025 mol/l RS* (13 + 87) a jejíž pH bylo upraveno *triethylaminem R* na hodnotu 3,0; průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 278 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Nastříkne se odděleně 50 μl zkoušeného roztoku (b) a po 50 μl porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek je retenční čas ciprofloxacinu asi 9 min. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku ciprofloxacinu nečistoty C na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) byla nejméně 40 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je rozlišení mezi píky ciprofloxacinu nečistoty B a ciprofloxacinu nečistoty C nejméně 1,3 a rozlišení mezi píky ciprofloxacinu a ciprofloxacinu nečistoty D je nejméně 3,0.

Nastříkne se odděleně 50 μl zkoušeného roztoku (a) a po 50 μl porovnávacích roztoků (b) a (c) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času ciprofloxacinu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plochy píků odpovídající ciprofloxacinu nečistotě C a ciprofloxacinu nečistotě D nejsou větší než plochy odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) a (c) (0,2 %); plochy jiných vedlejších píků nejsou větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2,5násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,25násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 0,5 g se rozpustí v *kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 30 ml. Přidají se 2 ml *vody R* místo 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5*. Filtrát vyhovuje limitní zkoušce E na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší ve vakuu při 120 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 80 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

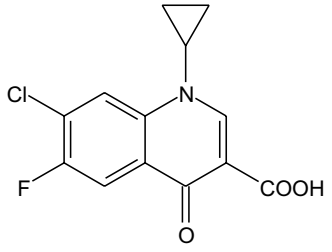
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,14 mg $C_{17}H_{18}FN_3O_3$.

Uchovávání

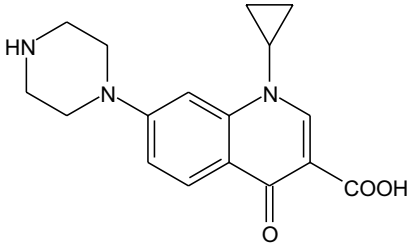
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

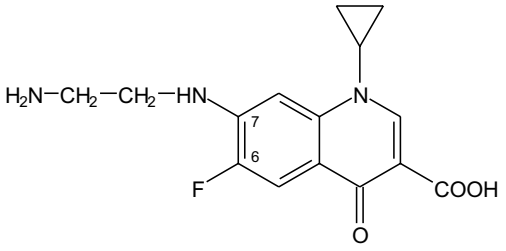
Nečistoty



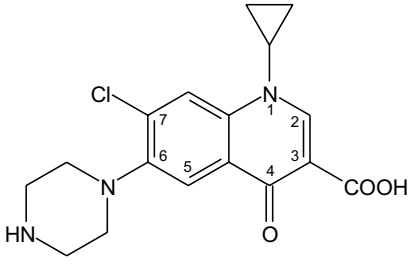
A. kyselina 1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-7-chlor-4-oxo-3-chinolinkarboxylová (kyselina fluorchinolonová),



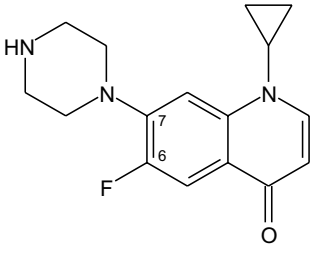
B. kyselina 1-cyklopropyl-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolinkarboxylová (defluorovaná sloučenina),



C. kyselina 7-[(2-aminoethyl)amino]-1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolinkarboxylová (ethylendiaminová sloučenina),



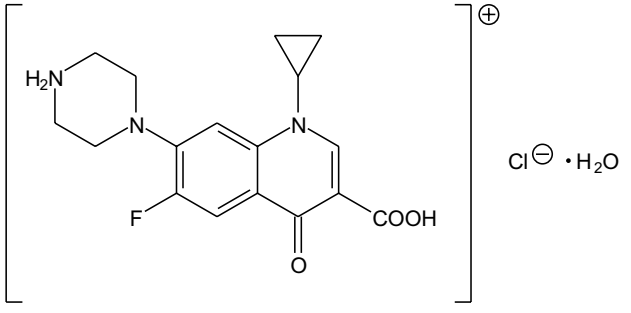
D. kyselina 1-cyklopropyl-1,4-dihydro-7-chlor-4-oxo-6-(1-piperazinyl)-3-chinolinkarboxylová (vedlejší sloučenina A),



E. 1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-7-(1-piperazinyl)-4-chinolon (dekarboxylovaná sloučenina).

† Ciprofloxacinum hydrochloridum

Ciprofloxaciniumchlorid



$C_{17}H_{19}ClFN_3O_3 \cdot H_2O$ M_r 385,82 CAS 86393-32-0

Je to monohydrát 1-{7[(1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-3-karboxy-4-oxo)chinolyl]}piperaziniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{17}H_{19}ClFN_3O_3$.

Vlastnosti

Světle žlutý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu, velmi těžce rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v acetonu, v ethylacetatu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ciprofloxaciniumchloridu CRL*.

B. 0,1 g vyhovuje zkoušce (b) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. 10 ml roztoku S se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_4$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 4,5; měří se roztok S.

Kyselina fluorochinolonová (ciprofloxacin nečistota A). Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyseliny fluorochinolonové CRL* se rozpustí ve směsi 0,1 ml *amoniaku zředěného RS1* a 90 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se ředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku. Na dno chromatografické komory se umístí odpařovací miska obsahující 50 ml *amoniaku 26% R*. Komora se uzavře a vrstva se na 15 min vystaví parám amoniaku. Pak se deska přenese do jiné chromatografické komory a vyvíjí

se směsí objemových dílů *acetonitrilu R*, *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající kyselině fluorochinolonové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se 50 μl zkoušeného roztoku a 50 μl porovnávacího roztoku (e) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času ciprofloxacinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku: plocha žádného píku odpovídajícího ciprofloxacinu nečistotě C a ciprofloxacinu nečistotě D není větší než plocha odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,2 %); plochy žádných píků nejsou větší než plocha ciprofloxacinu nečistoty C na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,2 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2,5násobek plochy píku ciprofloxacinu nečistoty C na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,25násobek plochy píku ciprofloxacinu nečistoty C na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 30 ml a provede se předfiltrace. Filtrát vyhovuje limitní zkoušce E na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 4,7 % až 6,7 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *ciprofloxaciniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 mg *ciprofloxacinu nečistoty B CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,5 mg *ciprofloxacinu nečistoty C CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 2,5 mg *ciprofloxacinu nečistoty D CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). Smíchá se 0,1 ml zkoušeného roztoku, 1,0 ml porovnávacího roztoku (b), 1,0 ml porovnávacího roztoku (c), 1,0 ml porovnávacího roztoku (d) a zředí se mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí asi 1,5 ml/min, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a kyseliny fosforečné (2,45 g H_3PO_4/l) (13 + 87), jejíž pH bylo předem upraveno *triethylenaminem R* na hodnotu 3,0,
- spektrofotometrického detektoru, 278 nm,

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min. Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (e). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek se látky

eluují v tomto pořadí: ciprofloxacin nečistota B, ciprofloxacin nečistota C, ciprofloxacin a ciprofloxacin nečistota D; retenční čas ciprofloxacinu je asi 9 min. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška píku ciprofloxacinu nečistoty C byla nejméně 40 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ciprofloxacinu nečistoty B a ciprofloxacinu nečistoty C je nejméně 1,3 a rozlišení mezi píky ciprofloxacinu a ciprofloxacinu nečistoty D je nejméně 3,0. Je-li třeba, upraví se složení mobilní fáze. Nastříkne se šestkrát 10 μl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku ciprofloxacinu nejvýše 1,0 %. Vstřikuje se střídavě 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (a).

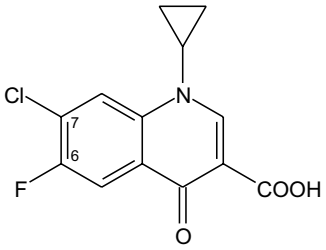
Obsah ciprofloxaciniumchloridu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

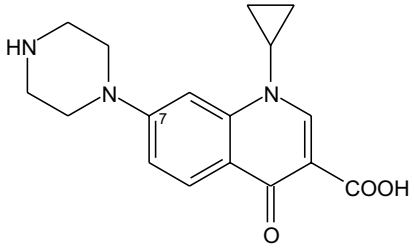
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

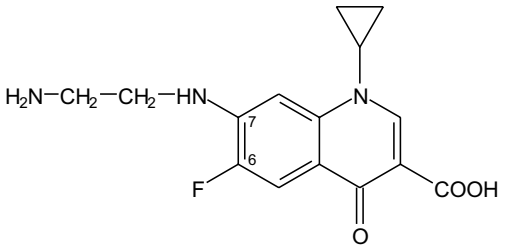
Nečistoty



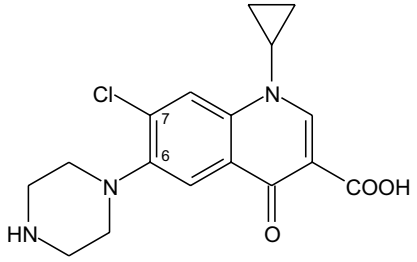
A. kyselina 1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-7-chlor-4-oxo-3-chinolinkarboxylová (kyselina fluorchinolonová),



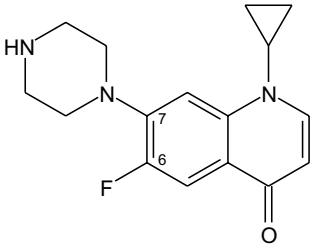
B. kyselina 1-cyklopropyl-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolinkarboxylová (defluorovaná sloučenina),



C. kyselina 7-[(2-aminoethyl)amino]-1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolinkarboxylová (ethylendiaminová sloučenina),



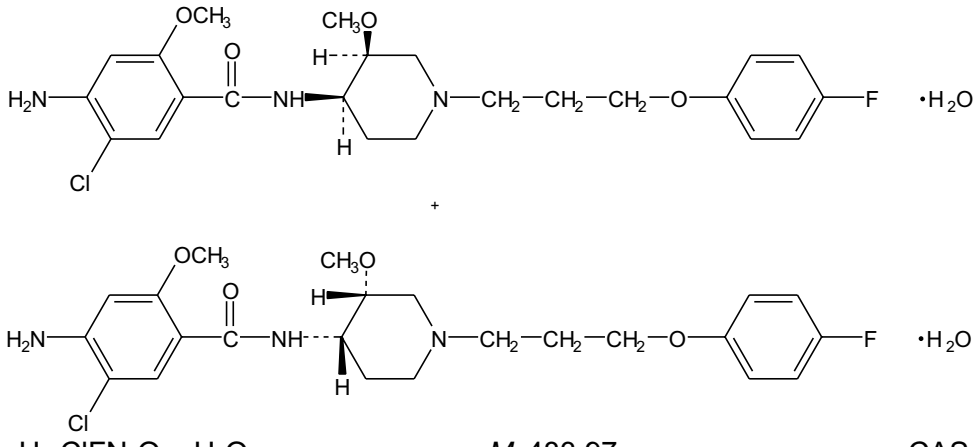
D. kyselina 1-cyklopropyl-1,4-dihydro-7-chlor-4-oxo-6-(1-piperazinyl)-3-chinolinkarboxylová (vedlejší sloučenina A),



E. 1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)chinolin (dekarboxylovaná sloučenina).

† Cisapridum

Cisaprid



$C_{23}H_{29}ClFN_3O_4 \cdot H_2O$ M_r 483,97 CAS 81098-60-4

Je to monohydrát (±)-*cis*-4-amino-5-chlor-N-{1-[3-(4-fluorofenoxy)propyl]-3-methoxy-4-piperidyl}-2-methoxybenzamidu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{29}ClFN_3O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu, dobře rozpustný v dichlormethanu a mírně rozpustný v methanolu.

Je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cisapridu CRL*. Jestliže se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v minimálním množství *methanolu R*, odpaří se do sucha v proudu vzduchu a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

B. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Po ochlazení se přidá 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do odbarvení roztoku a zfiltruje se. 1 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanoxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvení tohoto roztoku s barvou kontrolního roztoku připraveného stejným způsobem; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,05° až +0,05°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *cisapridu CRL* a 40,0 mg *haloperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (34 g/l) (2,5 + 7,5), s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Složení mobilní fáze se mění pomocí lineárního gradientu na směs objemových dílů výše uvedených složek (5 + 5) během 15 min a následuje eluce *methanolem R* po dobu 10 min,
- spektrofotometrického detektoru, 275 nm.

Kolona se alespoň 30 min promývá *methanolem R* a potom se nejméně 5 min ustaluje promýváním mobilní fází o počátečním složení.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Pokud se chromatogram zaznamenává za předepsaných podmínek, jsou retenční časy cisapridu asi 8 min a haloperidolu asi 9 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky haloperidolu a cisapridu není menší než 3,0. V případě potřeby se upraví množství methanolu v konečném složení mobilní fáze nebo časový program lineárního gradientu.

Nastříkne se odděleně 10 µl *methanolu R* jako kontrolní roztok, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům odpovídajícím píkům na chromatogramu kontrolního roztoku a k píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 3,4 % až 4,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 70 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 46,60 mg $C_{23}H_{29}ClFN_3O_4$.

Uchovávání

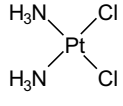
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. (±)-*cis*-4-amino-5-chlor-2-methoxy-N-[3-methoxy-1-(3-fenoxypropyl)-4-piperidyl]-benzamid,
B. 4-amino-5-chlor-N-{1-[3-(4-fluorfenoxy)propyl]-4-piperidyl}-2-methoxybenzamid,
C. (±)-*trans*-4-amino-5-chlor-N-{1-[3-(4-fluorfenoxy)propyl]-3-methoxy-4-piperidyl}-2-methoxybenzamid,
D. (±)-*cis*-4-amino-5-chlor-N-{2-chlor-4-[[1-[3-(4-fluorfenoxy)propyl]-3-methoxypiperidin-4-yl]aminokarbonyl]-5-methoxyfenyl}-2-methoxybenzamid,
E. (±)-*cis*-4-amino-5-chlor-N-{1-[3-(4-fluorfenoxy)propyl])-3-hydroxy-4-piperidyl}-2-methoxybenzamid.

† Cisplatinum

Cisplatina



$Cl_2H_6N_2Pt$ M_r 300,05 CAS 15663-27-1

Je to *cis*-diammindichloroplatnatý komplex. Obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $Cl_2H_6N_2Pt$.

Vlastnosti

Žlutý prášek nebo žluté až oranžově žluté krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v dimethylformamidu a prakticky nerozpustná v lihu 96%.

Rozkládá se při asi 270 °C za současného černání.

Zkouška totožnosti B, Zkoušky na čistotu (kromě zkoušky Stříbro) a Stanovení obsahu se provádějí za ochrany před světlem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cisplatiny CRL.* Tablety se připraví za použití *bromidu draselného R.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 50 mg se přidá k 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* ve skleněné misce a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí ve směsi 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a 1,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a odpaří se do sucha; zbytek je oranžový. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *vody R* a přidá se 0,5 ml *chloridu amonného RS;* vznikne žlutá krystalická sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 25 mg se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) připraveném za použití *vody prosté oxidu uhličitého R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 25 ml.

Roztok S2. 0,20 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku S1. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II).*

Vzhled roztoku S2. Roztok je čirý *(2.2.1).*

Hodnota pH *(2.2.3).* 4,5 až 6,0; měří se roztok S1 ihned po přípravě.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R1* aktivované zahříváním 1 h při 150 °C.

Zkoušený roztok (a). 1 ml roztoku S2 se zředí *dimethylformamidem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). Použije se roztok S2.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cisplatiny CRL* se rozpustí v 5 ml *dimethylformamidu R.*
Porovnávací roztok (b). 1 ml roztoku S2 se zředí *dimethylformamidem R* na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 2,5 µl zkoušeného roztoku (a), 2,5 µl porovnávacího roztoku (a), 5 µl zkoušeného roztoku (b) a 5 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *dimethylformamidu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *chloridu cínatého R* (50 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody R.* Po 1 h na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není žádná skvrna s R_F nižším, než je R_F hlavní skvrny, a žádná skvrna s R_F vyšším, než je R_F hlavní skvrny, intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Stříbro. Nejvýše 250 µg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I).*

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny dusičné R* zahřáté na 80 °C, ochladí se a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. K vhodným objemům (10 ml až 30 ml) základního *roztoku stříbra (5 µg Ag/ml)* se přidá 50 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Měří se absorbance při 328 nm za použití stříbrné lampy s dutou katodou jako zdroje záření, plamene vzduch-acetylen a spektrální štěrbiny šíře 0,5 nm. Současně se provede slepá zkouška.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *cisplatiny CRL* se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii, aniontovým měničem R* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a *methanolu R* (10 + 90), s průtokovou rychlostí 1,2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku.

Z plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku, plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku a deklarovaného obsahu *cisplatiny CRL* se vypočítá obsah cisplatiny v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Separandum.

Citri etheroleum

Citronová silice

Synonyma. Limonis aetheroleum, Oleum citri

CAS 8008-56-8

Je to silice získaná z čerstvého oplodí druhu *Citrus limon* (L.) BURM. fil. vhodným mechanickým postupem, bez použití tepla. Obsahuje 2,2 % až 4,5 % karbonylových sloučenin, počítáno jako citral ($C_{10}H_{16}O$; M_r 152,2).

Vlastnosti

Čirá těkavá světle žlutá až zelenožlutá kapalina.

Silice může být při nízkých teplotách zakalená. Je mísitelná s ethanolem, s etherem a kyselinou octovou ledovou.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 1 ml se smíchá s 1 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *citroptenu R* a 50 μl *citralu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *citroptenu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 10 μl *citralu R* a zředí se *toluenem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je ve střední části skvrna zhášející fluorescenci (citral) a v dolní třetině světle modře fluoreskující skvrna (citropten). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (a); kromě toho těsně nad skvrnou citralu je skvrna bergamotinu; pod skvrnou citralu je světle modře fluoreskující skvrna (5-geranyloxy-7-methoxykumarin); pod skvrnou citroptenu je skvrna odpovídající derivátu psoralenu a pod ní skvrna biakangelicinu. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna odpovídající derivátu psoralenu fluoreskuje zelenožlutě, skvrna citroptenu světle fialovomodře, skvrna 5-geranyloxy-7-methoxykumarinu světle modře a skvrna bergamotinu žlutě.

Zkoušky na čistotu

Optická otáčivost (*2.2.7*). +57° až +70°.

Relativní hustota (*2.2.5*). 0,850 až 0,858.

Index lomu (*2.2.6*). 1,474 až 1,476.

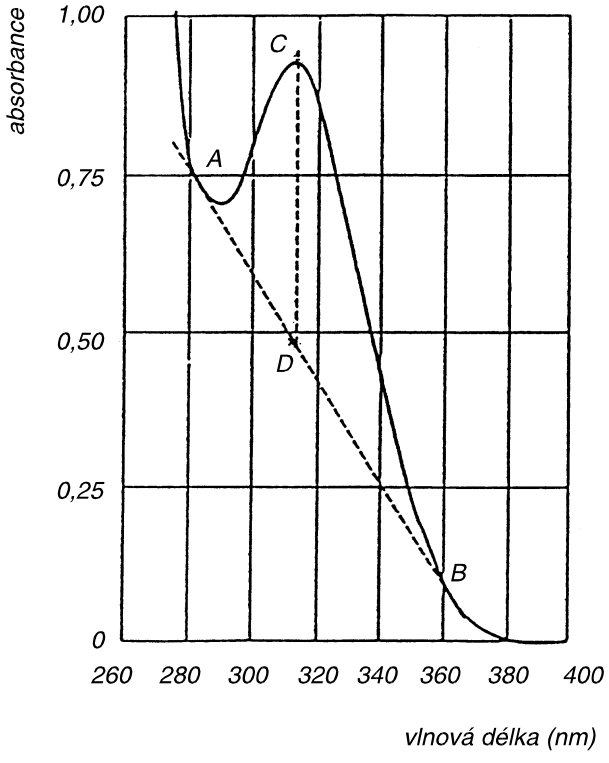
Absorbance (*2.2.25*). 0,250 g se rozpustí v *lihu 96% R*, zamíchá se a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 260 nm až 400 nm. Není-li k dispozici automatický přístroj, měří se absorbance v intervalech po 5 nm od vlnové délky 260 nm až do oblasti asi 12 nm před předpokládaným maximem absorpce, následující tři měření se provedou v intervalech po 3 nm, do asi 5 nm za maximem absorpce se použijí intervaly 1 nm a do dosažení vlnové délky 400 nm intervaly 10 nm.

Znázorní se graficky absorpční křivka tak, aby hodnoty absorbance byly uvedeny na ose Y a hodnoty vlnové délky na ose X. Spojí se body A a B (viz obrázek 1). Absorpční maximum C je při (315 ± 3) nm. Z bodu C se vede kolmice na osu X, zjistí se průsečík D s úsečkou AB. Od absorbance C se odečte absorbance v bodu D.

Nalezená hodnota absorbance je 0,20 až 0,96 a nejméně 0,45 pro citronovou silici italského typu.

Příměsi. Chromatogramy získané ve Zkoušce totožnosti se hodnotí v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je skvrna zhášející fluorescenci, která odpovídá citralu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná zhášející skvrna nad skvrnou odpovídající bergamotinu (methylanthranilat a methylsalicylat) nebo žádná zhášející skvrna ve stejné oblasti odpovídající citroptenu (chalkony) není intenzivnější než zhášející skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Chromatogram se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je světle modře fluoreskující skvrna citroptenu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná fialově nebo modře fluoreskující skvrna nad skvrnou odpovídající bergamotinu není intenzivnější než fluoreskující skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Vrstva se vystaví působení par kyseliny chlorovodíkové a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou v dolní třetině nebo ve střední části žádné červené skvrny (chalkony), světle modré nebo žluté skvrny (ostatní příměsi), ale mohou se objevit v horní třetině chromatogramu.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice (*2.8.7*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.



Obr. 1.

Cizí silice. Použije se destilační přístroj se čtyřmi destilačními patry, průměry pater od nejnižšího jsou 60 mm, 35 mm, 30 mm, 25 mm, vzdálenost mezi dnem baňky a bočním ramenem je 200 mm. Destiluje se 50 ml zkoušené látky rychlostí 1 kapka/s do získání 5 ml destilátu. Optická otáčivost (*2.2.7*) destilátu se může lišit od původní hodnoty optické otáčivosti silice nejvýše o 6°. Index lomu (*2.2.6*) destilátu se může lišit od původní hodnoty indexu lomu silice nejvýše o 0,003.

Zbytek po odpaření silic (*2.8.9*). 1,8 % až 3,6 %; zahřívá se 4 h na vodní lázni.

Stanovení obsahu

9,000 g zkoušené látky se smíchá s 20 ml *ethanolu R*. Přidá se 10,0 ml *hydroxylamoniumchloridu RS2* a 0,4 ml *modři bromfenolové RS2*. Titruje se zvolna *hydroxidem draselným v lihu 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení ze žluté na olivově zelenou. Nechá se stát 5 min, a je-li třeba, titruje se opět do změny zbarvení ze žluté na olivově zelenou.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* odpovídá 76,1 mg karbonylových sloučenin, počítáno jako citral ($C_{10}H_{16}O$).

Uchovávání

Ve zcela naplněných, vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

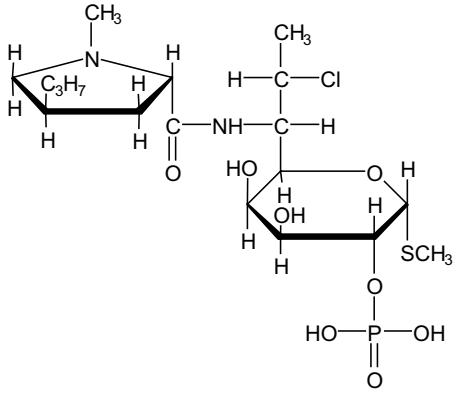
Označování

V označení na obalu se uvede, zda látka obsahuje citronovou silici italského typu.

† Clindamycini dihydrogenophosphas

Klindamycindihydrogenfosfat

Synonymum. Clindamycini phosphas



$C_{18}H_{34}ClN_2O_8PS$ M_r 504,96 CAS 24729-96-2

Je to 7-chlor-6,7,8-trideoxy-6-[(2*S*,4*R*)-1-methyl-4-propylpyrrolidin-2-karboxamido]-1- methylthio-L-*threo*-α-D-*galakto*-oktopyranosid-2-dihydrogenfosfat. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{18}H_{34}ClN_2O_8PS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý slabě hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu a v etheru.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *klindamycindihydrogenfosfatu CRL.* Měří se spektra látek, které se upraví takto: do dvou zkumavek se odděleně vpraví 50 mg zkoušené látky a 50 mg referenční látky, přidá se po 0,2 ml *vody R* a zahřívá se do úplného rozpuštění. Potom se za sníženého tlaku odpaří do sucha, suší se 2 h při 100 °C až 105 °C a se zbytky se připraví tablety s *bromidem draselným R.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *klindamycindihydrogenfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *linkomyciniumchloridu CRL* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 12 cm. Vrstva se suší 30 min při 100 °C až 105 °C a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (1 g/l). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 3 min se zahřívá na vodní lázni. Přidají se 4 ml *uhličitanu sodného RS* a 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (20 g/l). Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití *klindamycindihydrogenfosfatu CRL.* Zbarvení zkoušeného roztoku se shoduje se zbarvením porovnávacího roztoku.

D. K 0,1 g se přidá směs 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 5 ml *vody R* a vaří se 90 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 5 ml *kyseliny dusičné R,* protřepe se třikrát 15 ml *dichlormethanu R*, přičemž se dichlormethanová vrstva vždy odstraní. Vodná vrstva se zfiltruje přes papírový filtr. Filtrát vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,00 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se jí zředí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 4,5; měří se následující roztok: 5,0 ml roztoku S se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +115° až +130°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie postupem uvedeným ve zkoušce Stanovení obsahu. Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se zkoušený roztok a zaznamenává se chromatogram po dobu odpovídající retenčnímu času klindamycinu: na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, není větší než 2,5násobek plochy píku odpovídajícího klindamycindihydrogenfosfatu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, není větší než čtyřnásobek plochy píku odpovídajícího klindamycinhydrogenfosfatu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (4,0 %). K píkům, jejichž plocha je menší než 10,0 % plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c), se nepřihlíží.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 6,0 %; stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,6 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 75,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 75,0 mg *klindamycindihydrogenfosfatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 mg *linkomyciniumchloridu CRL* a 15,0 mg *klindamyciniumchloridu CRL* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, kterou je směs 200 ml *acetonitrilu R* a 800 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (13,6 g/l) a jejíž pH bylo předem upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2,5,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže první pík (linkomycin) je zřetelně oddělen od píku rozpouštědla a rozlišení mezi druhým píkem (klindamycindihydrogenfosfat) a třetím píkem (klindamycin) je nejméně 6,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, jestliže faktor symetrie píku klindamycindihydrogenfosfatu není větší než 1,5. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch píků klindamycindihydrogenfosfatu není větší než 1,0 %. Je-li třeba, upraví se nastavení integrátoru. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Obsah klindamycindihydrogenfosfatu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Jestliže se jedná o látku sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

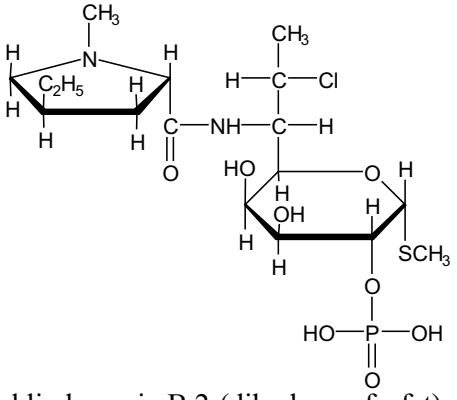
Separandum.

Označování

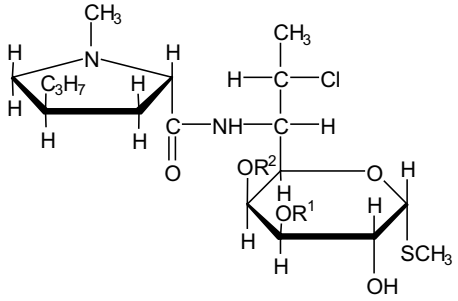
V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

A. linkomycin,



B. klindamycin B 2-(dihydrogenfosfat),



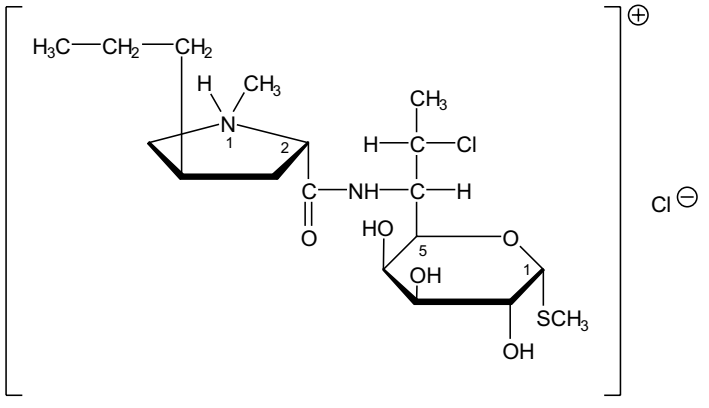
C. $R^1 = PO_3H_2$; $R^2 = H$, klindamycin 3-(dihydrogenfosfat),

D. $R^1 = H$; $R_2 = PO_3H_2$, klindamycin 4-(dihydrogenfosfat),

E. klindamycin.

† Clindamycini hydrochloridum

Klindamyciniumchlorid



$C_{18}H_{34}Cl_2N_2O_5S$ M_r 461,44 CAS 21462-39-5

Je to (2*S*)-*trans*-1-methyl-2-(7-chlor-6,7,8-trideoxy-1-methylthio-α-L-*threo*-D-*galakto*-oktopyranosyl)karboxamido-4-propylpyrrolidiniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 84,0 % až 93,0 % klindamycinu ($C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$). Látka může obsahovat různé množství vody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *klindamyciniumchloridu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *klindamyciniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *klindamyciniumchloridu CRL* a 10 mg *linkomyciniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *2-propanolu R,* roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo *amoniakem 17,5% RS* upraveno na 9,6, a *ethylacetatu R* (20 + 40 + 45) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (1 g/l). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní

skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 3 min se zahřívá na vodní lázni. Přidají se 3 ml *uhličitanu sodného RS* a 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (20 g/l); vznikne fialově červené zbarvení.

D. 0,1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 5,0; měří se následující roztok: 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +135° až +150°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,000 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy zkoušených roztoků (c) a (d) získané při stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (c) není součet ploch všech píků, kromě píku klindamycinu, větší než 3 % celkové plochy píků a žádný z těchto píků nemá plochu větší než 2 % celkové plochy. Plocha píku rozpouštědla se nebere v úvahu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška píku klindamycinu na chromatogramu zkoušeného roztoku (d) není menší než 70 % rozsahu stupnice zapisovače.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 6,0 %; provede se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *hexakosanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,15 g *hexakosanu R* se rozpustí v *dichlorethanu R* a zředí se jím na 100 ml.

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se třepáním rozpustí v 1,0 ml *trifluoracetanhydridu R* a nechá se 30 min stát. Poté se přidá 20,0 ml *dichlorethanu R* a promíchá se.

Zkoušený roztok (b). 50,0 mg se třepáním rozpustí v 1,0 ml *trifluoracetanhydridu R* a nechá se 30 min stát. Poté se přidá 20,0 ml roztoku vnitřního standardu a promíchá se.

Zkoušený roztok (c). 50,0 mg se rozpustí v 0,5 ml *trifluoracetanhydridu R*, nechá se 30 min stát a zředí se *dichlorethanem R* na 5,0 ml.

Zkoušený roztok (d). 1 ml zkoušeného roztoku (c) se *dichlorethanem R* zředí na 20 ml.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *klindamyciniumchloridu CRL* se třepáním rozpustí v 1,0 ml *trifluoracetanhydridu R* a nechá se 30 min stát. Poté se přidá 20,0 ml roztoku vnitřního standardu a promíchá se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (180 μm až 250 μm), impregnovanou 1 % *polyfenylmethylsiloxanu R,*
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

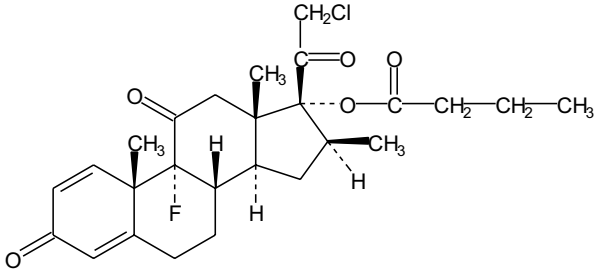
Teplota kolony je 170 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je 200 °C až 210 °C. Nastříknou se zvolené objemy zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku. Chromatogram zkoušeného roztoku (c) se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času klindamycinu.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

† Clobetasoni butyras

Klobetasonbutyrat



$C_{26}H_{32}ClFO_5$ M_r 478,99 CAS 25122-57-0

Je to 9-fluor-21-chlor-16β-methyl-3,11,20-trioxo-1,4-pregnadien-17-yl-butyrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{26}H_{32}ClFO_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 178 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *klobetasonbutyratu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *klobetasonbutyratu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *klobetasolpropionatu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *methylacetatu R* po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 5 mg se smísí s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku až do získání téměř bílého zbytku (obvykle do 5 min). Po vychladnutí se přidá 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, aby byl roztok bezbarvý. Zfiltruje se a 1 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se a po 5 min stání se porovnává zbarvení roztoku s kontrolním roztokem získaným při slepé zkoušce. Zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.27*). +127° až +133°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok získaný rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěný stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*). *Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v 5 ml *ethanolu R* a zředí se na 50,0 ml mobilní fází.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *klobetasonbutyratu CRL* a 1,5 mg *klobetasolpropionatu R* se rozpustí v 5 ml *ethanolu R* a zředí se na 100,0 ml mobilní fází.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí na 100,0 ml mobilní fází.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,20 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *ethanolu R* a *vody R* (45 + 55), průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 241 nm.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Použije-li se zapisovač, nastaví se citlivost systému tak, aby výšky obou hlavních píků nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (klobetasolpropionat) a druhým píkem (klobetasonbutyrat) není menší než 5,0.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jeden takový pík má plochu větší, než je polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

20,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 235 nm.

Vypočítá se obsah $C_{26}H_{32}ClFO_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 327.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

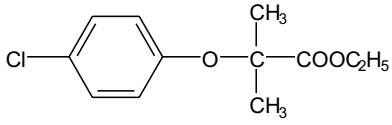
Nečistoty

A. klobetason,

B. (17*R*)-spiro[9α-fluor-16β-methyl-3,11-dioxoandrosta-1,4-dien-17,2′-4′-chlor-5′-propylfuran--3′(2′*H*)-on.

† Clofibratum

Klofibrát



$C_{12}H_{15}ClO_3$ M_r 242,70 CAS 637-07-0

Je to ethyl[2-(4-chlorfenoxy)-2-methylpropionat].

Vlastnosti

Čirá, téměř bezbarvá kapalina. Je velmi těžko rozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *klofibrátu CRL*.

B. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml (roztok a). Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 350 nm. Roztok (a) vykazuje absorpční maxima při 280 nm a 288 nm. Specifická absorbance v maximu při 280 nm je asi 44 a v maximu při 288 nm je asi 31. 10,0 ml roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100,0 ml a měří se absorbance při 220 nm až 250 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 226 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 460.

Zkoušky na čistotu

Index lomu *(2.2.6)*. 1,500 až 1,505.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,138 až 1,147.

Kysele reagující látky. K 1,0 g se přidá 10 ml *ethanolu R* a 0,1 ml *červeně fenolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Prchavé příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. K 10,0 g se přidá směs 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R*. Po protřepání se spodní organická vrstva oddělí, promyje se 5 ml *vody R*, které se přidají k vodné vrstvě. Organická vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a použije se jako zkoušený roztok. Vodná vrstva se uchová pro zkoušku 4-Chlorfenol.

Porovnávací roztok (a). 0,12 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,12 g *methyl[2-(4-chlorfenoxy)-2-methylpropionatu] CRL* se rozpustí ve zkoušené látce a zředí se jí na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušenou látkou na 10,0 ml a 1,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušenou látkou na 10,0 ml.

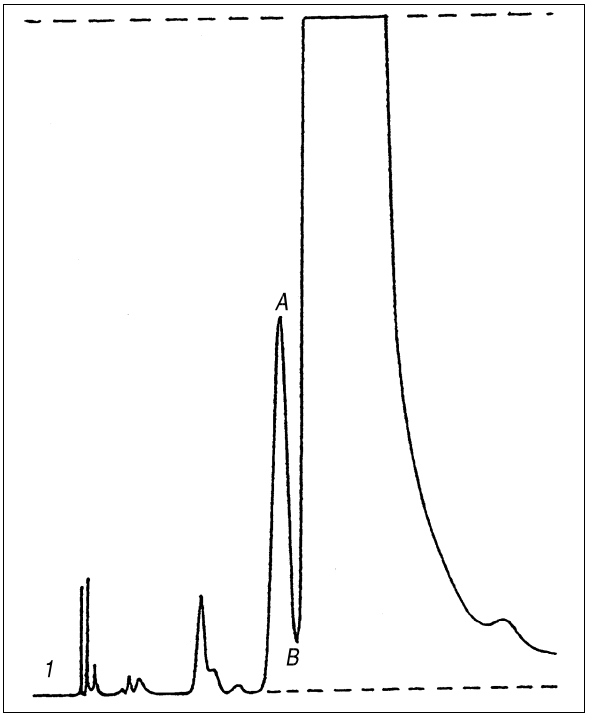
Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (250 μm až 420 μm), impregnovanou 30 % *polydimethylsiloxanu R*, nebo *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (150 μm až 180 μm), impregnovanou 10 % *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 185 °C a nastřikuje se po 2 μl každého roztoku.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě píku odpovídajícího klofibrátu, není větší než desetinásobek plochy píku klofibrátu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se změří od základní linie výška (A) píku odpovídajícího methyl[2-(4-chlorfenoxy)-2-methylpropionatu] a výška (B) nejnižšího bodu křivky oddělujícího tento pík od píku klofibrátu (obrázek 1).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška A je nejméně 30 % výšky celé stupnice zapisovače a rozdíl A - B je větší než 75 % výšky A.



Obr. 1. Typický chromatogram pro zkoušku Prchavé příbuzné látky

4-Chlorfenol. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. Vodná vrstva ze zkoušky Prchavé příbuzné látky se protřepe dvakrát 5 ml *chloroformu R* a odstraní se organické vrstvy. Vodná vrstva se okyselí přidáním *kyseliny chlorovodíkové R* po kapkách.

Protřepe se třikrát 3 ml *chloroformu R* a spojené chloroformové výtřepky se zředí *chloroformem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,25 g *chlorfenolu R* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 100,0 ml.

Použije se chromatografický postup uvedený ve zkoušce Prchavé příbuzné látky. Nastříkne se po 2 μl každého roztoku.

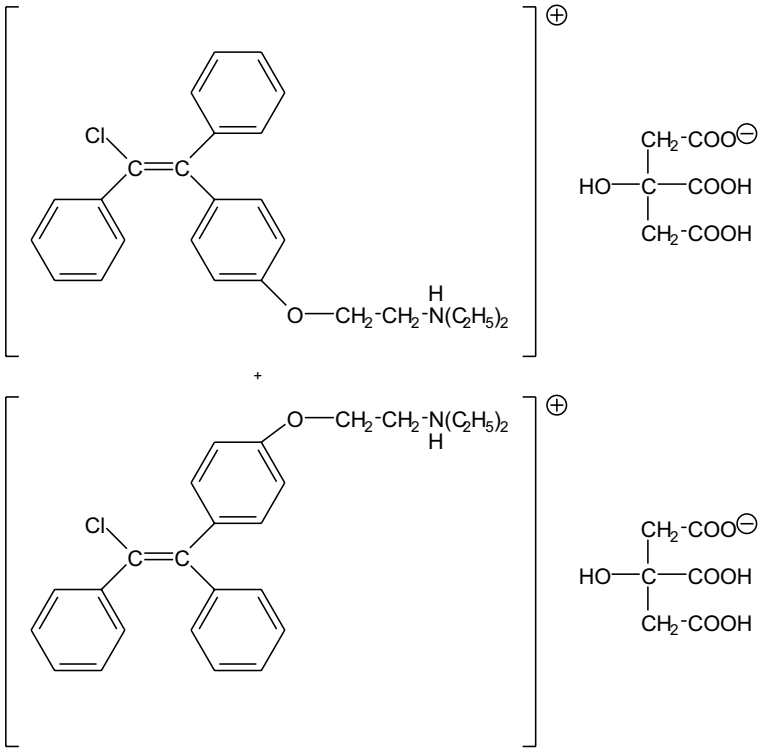
Plocha žádného píku odpovídajícího 4-chlorfenolu na chromatogramu zkoušeného roztoku není větší než plocha píku odpovídajícího 4-chlorfenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (25 μg/g).

Uchovávání

Separandum.

† Clomifeni dihydrogenocitras

Klomifeniumdihydrogencitrat



$C_{32}H_{36}ClNO_8$ M_r 598,09 CAS 50-41-9

Je to směs *E*- a *Z*-izomerů 2-{[4-(2-chlor-1,2-difenylvinyl)fenoxy]-ethyl}amoniumdihydrogencitratu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{32}H_{36}ClNO_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *klomifeniumdihydrogencitratu CRL*. Tablety se připraví za použití *bromidu draselného R.*

B. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml směsi objemových dílů *acetanhydridu R* a *pyridinu R* (1 + 5) a zahřeje se ve vodní lázni; vznikne tmavě červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztoky se připravují za ochrany před světlem v hnědých skleněných nádobách. Je třeba zajistit, aby roztoky byly na denním světle do chromatografického stanovení co nejkratší dobu.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 12,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 12,5 mg *klomifeniumdihydrogencitratu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem butylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze připravené takto: 400 ml *acetonitrilu R* se smíchá se 600 ml *vody R*, přidá se 8,0 ml *diethylaminu R* a pH směsi se upraví na hodnotu 6,2 opatrným přidáním 1 ml až 2 ml *kyseliny fosforečné R;* průtoková rychlost je 1,2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 233 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází o průtoku 1,2 ml/min po dobu 1 h. Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Změří se výška (A) píku odpovídajícího klomifenu nečistotě A a výška (B) nejnižšího bodu křivky dělící tento pík od píku klomifenu nad základní linií. Zkoušku lze hodnotit, jestliže hodnota výšky A je 15krát vyšší než hodnota výšky B a získaný chromatogram odpovídá porovnávacímu chromatogramu. V případě potřeby se upraví koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a zaznamenává se chromatogram po dobu odpovídající čtyřnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku 2-[4-(1,2-difenylvinyl) fenoxy]triethylaminu větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %).

Nepřihlíží se k píkům s relativním retenčním časem vztaženým ke klomifenu 0,2 nebo menším a k píkům s plochou menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

***Z*-izomer.** 30,0 % až 50,0 %; stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve 25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, přidá se 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a protřepe se třikrát 25 ml *chloroformu prostého ethanolu R.* Spojené výtřepky se promyjí 10 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zředí se *chloroformem prostým ethanolu R* na 100 ml. Ke 20 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml *triethylaminu R* a zředí se *hexanem R* na 100 ml.

Porovnávací roztok. 25 mg *klomifeniumdihydrogencitratu CRL* se rozpustí ve 25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, přidá se 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a protřepe se třikrát 25 ml *chloroformu prostého ethanolu R.* Spojené výtřepky se promyjí 10 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zředí se *chloroformem prostým ethanolu R* na 100 ml. Ke 20 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml *triethylaminu R* a zředí se *hexanem R* na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,3 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *triethylaminu R, chloroformu prostého ethanolu R* a *hexanu R* (1 + 200 + 800); průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 302 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází po dobu 2 h. Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku. Na získaném chromatogramu je pík *E*-izomeru umístěn před píkem *Z*-izomeru. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem *E*-izomeru a píkem *Z*-izomeru není menší než 1,0. Je-li třeba, upraví se poměr chloroformu prostého ethanolu a hexanu v mobilní fázi. Měří se plocha píku *Z*-izomeru na chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Vypočítá se procentuální obsah *Z*-izomeru z celkového množství klomifeniumdihydrogencitratu za použití deklarovaného obsahu *klomifeniumdihydrogencitratu CRL*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 59,81 mg $C_{32}H_{36}ClNO_8$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. 2-[4-(1,2-difenylvinyl)fenoxy]triethylamin,

B. 4-(2-diethylaminoethoxy)benzofenon,

C. 2-[4-(2-diethylaminoethoxy)fenyl]-2-fenylacetofenon,

D. 2,2-bis[4-(2-diethylaminoethoxy)fenyl]-2-fenylacetofenon,

E. 2-{4-[1,2-bis(4-chlorfenyl)vinyl]fenoxy}triethylamin,

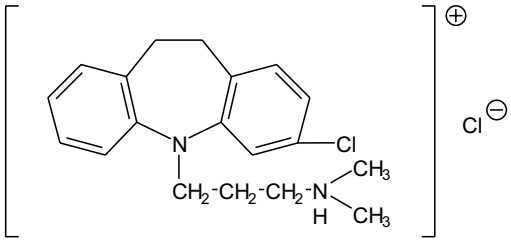
F. 2-{4-[2-chlor-2-(4-chlorfenyl)-1-fenylvinyl]fenoxy}triethylamin,

G. 2-[2-chlor-4-(2-chlor-1,2-difenylvinyl)fenoxy]triethylamin (výše tající izomer),

H. 2-[2-chlor-4-(2-chlor-1,2-difenylvinyl)fenoxy]triethylamin (níže tající izomer).

† Clomipramini hydrochloridum

Klomipraminiumchlorid



$C_{19}H_{24}Cl_2N_2$ M_r 351,32 CAS 17321-77-6

Je to N,N-dimethyl-{3-[5-(10,11-dihydro-3-chlor-5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepinyl)]propyl}amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{24}Cl_2N_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek, slabě hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 191 °C až 195 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *klomipraminiumchloridu CRL*. Tablety se připraví za použití *chloridu draselného R.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné R;* vzniká intenzivní modré zbarvení.

E. Asi 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *amoniaku zředěného RS1*, promíchá se, nechá se 5 min stát a zfiltruje se. Filtrát se okyselí *kyselinou dusičnou zředěnou RS;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 5,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*. *Roztoky se připraví v čas potřeby za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *klomipraminiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *imipraminiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 5 ml. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (c).

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R* a *ethylacetatu R* (5 + 25 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *dichromanu draselného R* (5 g/l) v roztoku *kyseliny sírové R* 20% (*V/V*) a vrstva se ihned pozoruje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna odpovídající imipraminu intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající imipraminu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* se odečte mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,13 mg sloučeniny $C_{19}H_{24}Cl_2N_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

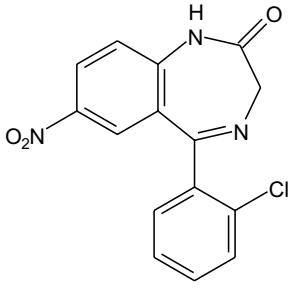
Nečistoty

A. imipraminiumchlorid,

B. 3-chlor-10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepin.

§ Clonazepamum

Klonazepam



$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$ M_r 315,72 CAS 1622-61-3

Je to 5-(2-chlorfenyl)-7-nitro-2,3-dihydro-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-on.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$.

Vlastnosti

Slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu, velmi těžce rozpustný v etheru.

Taje při asi 239 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.

Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. *Roztoky se chrání před světlem a měření se provádí ihned po jejich přípravě.*

20,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 340 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 248 nm a 310 nm. Specifické absorbance v maximech jsou 450 až 470 a 350 až 370.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *klonazepamu CRL*.

C. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připraví v čas potřeby*. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 8 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 8 mg *klonazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 8 mg *klonazepamu CRL* a 8 mg *flunitrazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *nitromethanu R* (15 + 85) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného

roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 20 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R*, 5 min se vaří a ochladí se. Přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l) a směs se nechá 1 min stát. Přidá se 1 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (5 g/l), zamíchá se a nechá se 1 min stát. Přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l); vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připraví v čas potřeby.* Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,40 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 20 ml. 1 ml roztoku se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *klonazepamu nečistoty A CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml. 2 ml roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *klonazepamu nečistoty B CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml. 2 ml roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl každého porovnávacího roztoku a vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *1,1,1-trichlorethanu R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna odpovídající klonazepamu nečistotě A na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Žádná skvrna odpovídající klonazepamu nečistotě B na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících klonazepamu nečistotě A a klonazepamu nečistotě B, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,275 g se rozpustí v 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,57 mg $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

Nečistoty

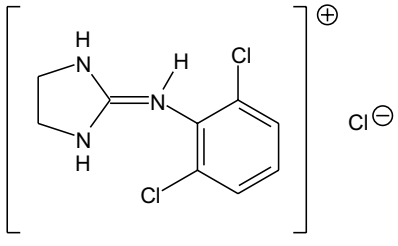
A. 2-amino-2′-chlor-5-nitrobenzofenon,

B. 3-amino-4-(2-chlorfenyl)-6-nitro-1*H*-chinolin-2-on.

† Clonidini hydrochloridum

Klonidiniumchlorid

Synonymum. Clonidinium chloratum



$C_9H_{10}Cl_3N_3$ M_r 266,56 CAS 4205-91-8

Je to N-(imidazolidin-2-diyl)-2,6-dichlorfenyliminiumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{10}Cl_3N_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 245 až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 272 nm a 279 nm, a bod inflexe při 265 nm. Specifická absorbance v maximu při 272 nm je asi 18 a v maximu při 279 nm je asi 16.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *klonidiniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *klonidiniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Příprava mobilní fáze. Směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R, 1-butanolu R* a *vody R* (10 + 40 + 50) se důkladně protřepe a nechá se oddělit. Použije se vrchní zfiltrovaná vrstva.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *jodobismutitanem draselným RS2* a suší se 1 h na vzduchu. Potom se postříká znovu *jodobismutitanem draselným RS2* a ihned se postříká roztokem *dusitanu sodného R* (50 g/l). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 70 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,66 mg $C_9H_{10}Cl_3N_3$.

Uchovávání

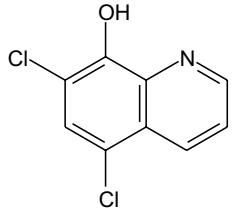
V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Cloroxinum

N

Kloroxin

Synonymum. Dichlorchinolinolum



$C_9H_5Cl_2NO$ M_r 214,05 CAS 773-76-2

Je to 5,7-dichlor-8-chinolinol. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_9H_5Cl_2NO$.

Vlastnosti

Téměř bílý až slabě šedohnědý amorfní prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a mírně rozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích minerálních kyselin a v roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 181 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 30,0 mg se rozpustí mírným zahřátím v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a po ochlazení se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje maximum při 260 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je 1900 až 2150.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *kloroxinu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, velikostí a intenzitou zhášení fluorescence shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Absorbance. 0,20 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové RS1* a zředí se jí na 10,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 490 nm není vyšší než 0,45.

Monochlorchinolinol. Nejvýše 1,0 %. Asi 0,500 g se v baňce se zabroušenou zátkou rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1*, přidá se 5,0 ml roztoku *bromidu draselného R* (200 g/l), 10,0 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* a po

promíchání se přidá asi 1 g *jodidu draselného R*. Baňka se uzavře, její obsah se promíchá a nechá se stát 3 min ve tmě. Potom se přidá asi 50 ml *vody R* a vyloučený jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *škrobu RS* jako indikátoru do odbarvení; ke konci titrace nutno přidávat odměrný roztok velmi pomalu. Nalezená spotřeba se odečte od spotřeby zjištěné ve slepé zkoušce.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,98 mg C_9H_6ClNO.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R* rovnoměrně postříkané *edetanem disodným 0,1 mol/l RS* a sušené 30 min při 80 °C.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 0,10 g *kloroxinu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 100,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *benzenu R, kyseliny octové ledové R* a *vody R* (100 + 10 + 0,1) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, nepřevyšuje velikostí a intenzitou zhášení skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %).

Aktivní chlor. 0,5 g se důkladně protřepe s 10 ml *vody R* a zfiltruje se. 5,0 ml filtrátu se zředí 5,0 ml *vody R*, přidá se asi 0,05 g *jodidu draselného R* a 3 kapky *škrobu RS;* roztok se nezbarví modře.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 1,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,40 mg $C_9H_5Cl_2NO$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

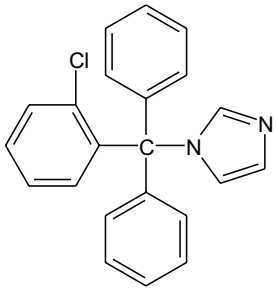
A. 8-chinolinol,

B. 5-chlor-8-chinolinol,

C. 7-chlor-8-chinolinol.

† Clotrimazolum

Klotrimazol



$C_{22}H_{17}ClN_2$ M_r 344,84 CAS 23593-75-1

Je to 1-[(2-chlorfenyl)difenylmethyl]-1*H*-imidazol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{17}ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 141 °C až 145 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *klotrimazolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce (2-Chlorfenyl)difenylmethanol, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm před postříkáním. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí ve 3 ml *kyseliny sírové R;* roztok je světle žlutý. Přidá se 10 mg *oxidu rtuťnatého R* a 20 mg *dusitanu sodného R* a nechá se stát za občasného protřepání; vzniká oranžové zbarvení, které přechází na oranžově hnědé.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

(2-Chlorfenyl)difenylmethanol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 50 mg *klotrimazolu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml. *Porovnávací roztok (b).* 10 mg *(2-chlorfenyl)difenylmethanolu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml. 1 ml roztoku se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R, 1-propanolu R* a *toluenu R* (0,5 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny sírové R* 10% *(V/V)* v *lihu 96% R* a zahřívá se 30 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna odpovídající (2-chlorfenyl)difenylmethanolu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Imidazol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *imidazolu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml roztoku se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R, 1-propanolu R* a *toluenu R* (0,5 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a vloží se na 5 min do chromatografické komory předem 15 min sycené odpařováním směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS1, vody R* a roztoku *manganistanu draselného R* (15 g/l) (1 + 1 + 2) vložené do komory na misce. Potom se vrstva suší proudem studeného vzduchu do odstranění nadbytku chloru; vrstva pod nanesenými body nereaguje s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS* za vzniku modrého zbarvení. Vrstva se postříká *škrobem s jodidem draselným RS.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající imidazolu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 80 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,3 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědožlutého zbarvení roztoku na zelené.

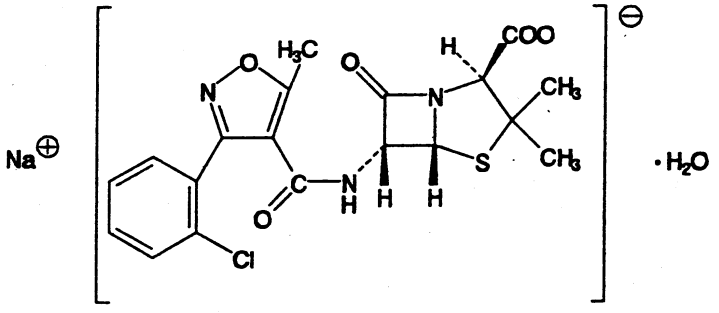
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,48 mg $C_{22}H_{17}ClN_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Cloxacillinum natricum

Sodná sůl kloxacilinu



$C_{19}H_{17}ClN_3NaO_5S \cdot H_2O$ $_r$ 475,88 CAS 7081-44-9

$_r$ bezvodé 457,86

Je to monohydrát sodné soli kyseliny (6*R*)-6-[3-(2-chlorfenyl)-5-methyl-4-isoxazolkarboxamido]-penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{17}ClN_3NaO_5S$.

Výroba

Pokud se vyrábí způsobem, který může v látce zanechat zbytky kyseliny 2-ethylhexanové, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,8 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, hygroskopický. Je snadno rozpustná ve vodě a v methanolu, dobře rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum tablety zkoušené látky (*2.2.24*) se shoduje se spektrem tablety *sodné soli kloxacilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného H R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *vody R.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli kloxacilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R.*
Porovnávací roztok (b). 25 mg *sodné soli kloxacilinu CRL*, 25 mg *sodné soli dikloxacilinu CRL* a 25 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R*, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a vystaví se působení par jodu, dokud se neobjeví skvrny. Hodnotí se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže jsou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) patrny tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je slabě zelenožlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; roztok zežloutne.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). Absorbance roztoku S měřená při 430 nm (*2.2.25*) je nejvýše 0,04.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +160° až +169°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve stati Stanovení obsahu. Nastříkne se zkoušený roztok (a) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času hlavního píku. Vstříkne se porovnávací roztok (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než pětinásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 µg/g. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se ve zkumavce se zabroušenou zátkou přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,

- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 4,5 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,40 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *sodné soli kloxacilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* a 5 mg *sodné soli kloxacilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, kterou je směs objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (2,7 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na hodnotu 5,0, a *acetonitrilu R* (75 + 25),
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že rozlišení mezi prvním píkem (kloxacilin) a druhým píkem (flukloxacilin) je nejméně 2,5. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku kloxacilinu je nejvýše 1 %. Zkoušený roztok (a) a porovnávací roztok (b) se vstřikují střídavě.

Uchovávání

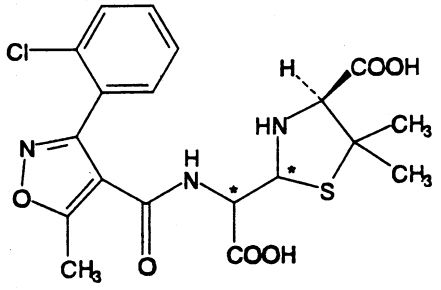
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

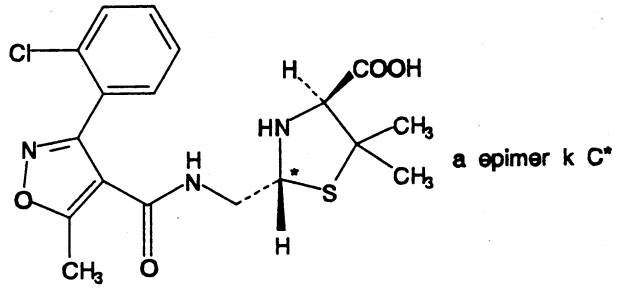
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

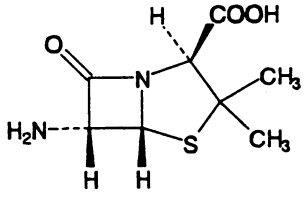
Nečistoty



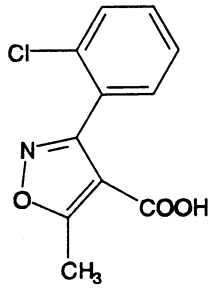
A. kyselina (4*S*)-2-{karboxy{[[3-(2-chlorfenyl)-5-methylisoxazol-4-yl]karbonyl]amino]methyl]-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny kloxacilinu),



B. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{{[[3-(2-chlorfenyl)-5-methylisoxazol-4-yl]karbonyl]amino}methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylové (penilové kyseliny kloxacilinu),



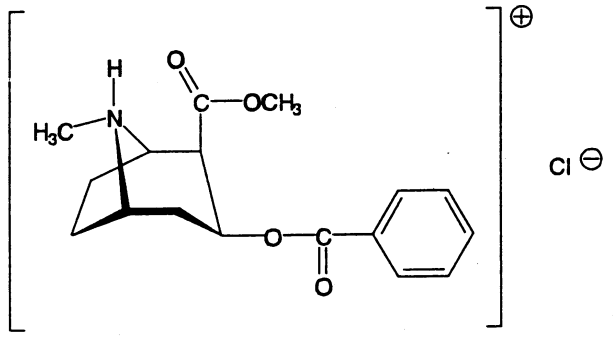
C. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



D. kyselina 3-(2-chlorfenyl)-5-methylisoxazol-4-karboxylová.

§§ Cocaini hydrochloridum

Kokainiumchlorid



$C_{17}H_{22}ClNO_4$ M_r 339,82 CAS 53-21-4

Je to (2*R*,3*S*)-3ß-benzoyloxy-2ß-methoxykarbonyl-1α*H*,5α*H*-tropaniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{22}ClNO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, nahořklé ostré chuti s následným znecitlivěním jazyka. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 197 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. 20 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maxima při 233 nm a 273 nm; specifická absorbance v maximu při 233 nm je asi 390 a v maximu při 273 nm je asi 31.

B. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *amoniaku, zředěného RS2;* vznikne bílá krystalická sraženina, jejíž vznik se urychlí třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky.

B. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *amoniaku, zředěného RS2;* vznikne bílá krystalická sraženina, jejíž vznik se urychlí třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky. Sraženina se promyje *vodou R*, vysuší se ve vakuu a stanoví se teplota tání *(2.2.14)*, která je 96 °C až 99 °C.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

D. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -70° až -73°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20,0 ml.

Snadno zuhelnitelné látky. K 0,2 g se přidají 2 ml *kyseliny sírové R*. Po 15 min není zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení barevného porovnávacího roztoku $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Cynamoylkokain a redukující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS*, 0,5 ml *manganistanu draselného 0,004 mol/l VS* a nechá se 30 min stát za ochrany před světlem; růžové zbarvení roztoku úplně nezmizí.

Truxilliny. K 7,5 ml roztoku S se přidá 72,5 ml *vody R*, 0,2 ml *amoniaku zředěného RS1* a nechá se 15 min stát. Krystalizace se urychlí třením skleněné tyčinky o stěnu kádinky; vylučuje se krystalická sraženina a po jejím usazení je tekutina nad sraženinou čirá.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *dioxanu R*, 7 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru do vzniku čistě modrého zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,98 mg $C_{17}H_{22}ClNO_4$.

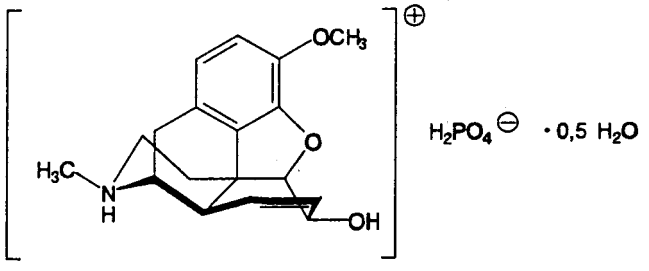
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Omamná látka.

§§ Codeini dihydrogenophosphas hemihydricus

Hemihydrát dihydrogenkodeiniumfosfatu



$C_{18}H_{24}NO_7P$. $0,5H_2O$ M_r 406,37 CAS 41444-62-6

M_r bezvodého 397,36

Je to hemihydrát (5*R*,6*S*,9*R*,13*S*,14*R*)-(4,5-epoxy-6-hydroxy-3-methoxy-N-methyl-7-morfinenium)dihydrogenfosfatu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{24}NO_7P$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo malé bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 25,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml *vody R* a 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 250 nm až 350 nm. Roztok vykazuje pouze jedno absorpční maximum, a to při 284 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 38, počítáno na vysušenou látku.

B. 0,20 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidá se 1 ml směsi stejných objemových dílů *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a *vody R*. Třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky za chlazení ve vodě s ledem se iniciuje vyloučení krystalické sraženiny, která se promyje *vodou R* a vysuší při 100 C až 105 C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety připravené z vysušené sraženiny a *bromidu draselného R* se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kodeinu.*

C. 0,20 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidá se 1 ml směsi stejných objemových dílů *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a *vody R*. Třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky za chlazení ve vodě s ledem se iniciuje vyloučení krystalické sraženiny, která se promyje *vodou R* a vysuší při 100 C až 105 C. Sraženina taje *(2.2.14)* při 155 C až 159 C.

D. K asi 10 mg se přidá 1 ml *kyseliny sírové R*, 0,05 ml *chloridu železitého RS2* a zahřeje se na vodní lázni; vzniká modré zbarvení. Přidá se 0,05 ml *kyseliny dusičné R;* zbarvení se mění na červené.

E. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na fosforečnany *(2.3.1)*.

F. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -98° až -102°, počítáno na vysušenou látku. Měří se 5,0 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10,0 ml.

Cizí alkaloidy. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* (1 + 4) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* (1 + 4) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, cyklohexanu R* a *ethanolu R* (6 + 30 + 72) po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *jodobismutitanem draselným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna nad hlavní skvrnou je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Morfin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 5 ml. Přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (10 g/l), nechá se 15 min stát a potom se přidají 3 ml *amoniaku zředěného RS1;* roztok není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok H_4 *(2.2.2, Metoda II)* (asi 0,13 % morfinu).

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 20 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 1,5 % až 3,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *dioxanu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 39,74 mg $C_{18}H_{24}NO_7P$.

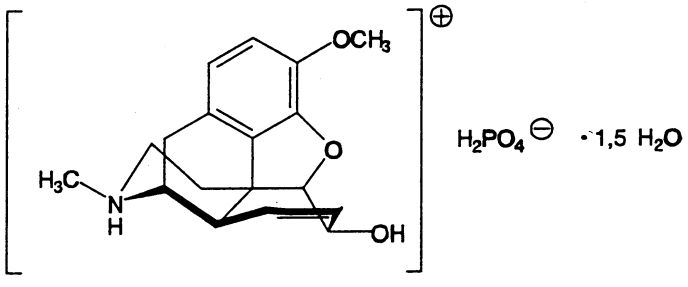
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Omamná látka.

§§ Codeini dihydrogenophosphas sesquihydricus

Seskvihydrát dihydrogenkodeiniumfosfatu

Synonyma. Codeinium dihydrogenphosphoricum, Codeinium phosphoricum, Codeini phosphas, dihydrogenfosforečnan kodeinia



$C_{18}H_{24}NO_7P$. $1,5H_2O$ M_r 424,39 CAS 5913-76-8
M_r bezvodého 397,36

Je to seskvihydrát (5*R*,6*S*,9*R*,13*S*,14*R*)-(4,5-epoxy-6-hydroxy-3-methoxy-N-methyl-7-morfinenium)dihydrogenfosfatu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{24}NO_7P$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo malé bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 25,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml *vody R* a 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 250 nm až 350 nm. Roztok vykazuje pouze jedno absorpční maximum, a to při 284 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 38, počítáno na vysušenou látku.

B. 0,20 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidá se 1 ml směsi stejných objemových dílů *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a *vody R*. Třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky za chlazení ve vodě s ledem se iniciuje vyloučení krystalické sraženiny, která se promyje *vodou R* a vysuší při 100 °C až 105 °C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety připravené

z vysušené sraženiny a *bromidu draselného R* se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kodeinu*.

C. 0,20 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidá se 1 ml směsi stejných objemových dílů *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a *vody R*. Třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky za chlazení ve vodě s ledem se iniciuje vyloučení krystalické sraženiny, která se promyje *vodou R* a vysuší při 100 °C až 105 °C. Sraženina taje *(2.2.14)* při 155 °C až 159 °C.

D. K asi 10 mg se přidá 1 ml *kyseliny sírové R*, 0,05 ml *chloridu železitého RS2* a zahřeje se na vodní lázni; vzniká modré zbarvení. Přidá se 0,05 ml *kyseliny dusičné R;* zbarvení se mění na červené.

E. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na fosforečnany *(2.3.1)*.

F. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -98° až -102°, počítáno na vysušenou látku. Měří se 5,0 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10,0 ml.

Cizí alkaloidy. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* (1 + 4) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* (1 + 4) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, cyklohexanu R* a *ethanolu R* (6 + 30 + 72) po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *jodobismutitanem draselným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna nad hlavní skvrnou je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Morfin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 5 ml. Přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (10 g/l), nechá se 15 min stát a potom se přidají 3 ml *amoniaku zředěného RS1;* roztok není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok H_4 *(2.2.2, Metoda II)* (asi 0,13 % morfinu).

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 20 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 5,0 % až 7,5 %; 0,50 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *dioxanu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 39,74 mg $C_{18}H_{24}NO_7P$.

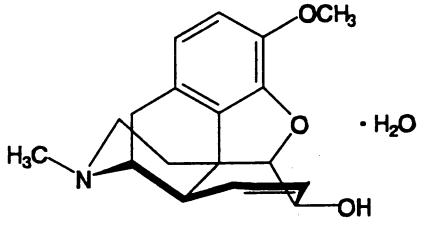
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Omamná látka.

§§ Codeinum

Kodein



$C_{18}H_{21}NO_3 . H_2O$ M_r 317,38 CAS 6059-47-8

M_r bezvodého 299,37

Je to monohydrát (5*R*,6*S*,9*R*,13*S*,14*R*)-4,5-epoxy-3-methoxy-N-methyl-7-morfinen-6-olu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{21}NO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vroucí vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.

Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 155 C až 159 C.

B. K 2,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 50 ml *vody R*, 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 250 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 284 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 50, počítáno na vysušenou látku.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety vysušené zkoušené látky s *bromidem draselným R* se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kodeinu.*

D. K asi 10 mg se přidá 1 ml *kyseliny sírové R*, 0,05 ml *chloridu železitého RS2* a zahřeje se na vodní lázni; vzniká modré zbarvení. Přidá se 0,05 ml *kyseliny dusičné R;* zbarvení se mění na červené.

E. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 50 mg se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. Vyšší než 9; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -142° až -146°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g v *lihu 96% R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Cizí alkaloidy. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *ethanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *ethanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, cyklohexanu R* a *ethanolu R* (6 + 30 + 72) po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *jodobismutitanem draselným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna nad hlavní skvrnou je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Morfin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 5 ml. Přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (10 g/l), nechá se 15 min stát a potom se přidají 3 ml *amoniaku zředěného RS1;* roztok není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok H_4 *(2.2.2, Metoda II)* (asi 0,13 % morfinu).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 5,0 % až 6,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *dioxanu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

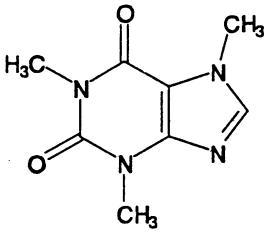
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,94 mg $C_{18}H_{21}NO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Omamná látka.

† Coffeinum

Kofein



$C_8H_{10}N_4O_2$ M_r 194,19 CAS 58-08-2

Je to 1,3,7-trimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_8H_{10}N_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo jemné bílé krystalky, snadno sublimující. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v etheru. Rozpouští se v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 234 C až 239 C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kofeinu CRL*.

C. Ke 2 ml nasyceného roztoku se přidá 0,05 ml *jodu RS;* roztok zůstane čirý. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS;* vznikne hnědá sraženina. Po zneutralizování *hydroxidem sodným zředěným RS* se sraženina rozpouští.

D. Asi 10 mg se ve zkumavce se skleněnou zátkou rozpustí v 0,25 ml směsi 0,5 ml *acetylacetonu R* a 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Zahřívá se ve vodní lázni 7 min při 80 C. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS2* a zahřívá se znovu ve vodní lázni 7 min při 80 C. Nechá se ochladit, přidá se 10 ml *vody R;* vzniká intenzivní modré zbarvení.

E. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

F. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí zahřátím v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R*, ochladí se a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je zelený nebo žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, acetonu R, chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 7,5 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 7,5 ml *vody destilované R.*

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %. 1,000 g se suší v sušárně 1 h při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,170 g se rozpustí zahřátím v 5 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Nechá se ochladit, přidá se 10 ml *acetanhydridu R,* 20 ml *toluenu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

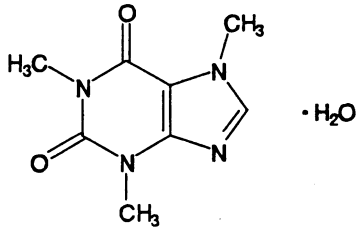
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,42 mg $C_8H_{10}N_4O_2$.

Uchovávání

Separandum.

† Coffeinum monohydricum

Monohydrát kofeinu



$C_8H_{10}N_4O_2 . H_2O$ M_r 212,21 CAS 5743-12-4

Je to monohydrát 1,3,7-trimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindionu. Vysušen předepsaným způsobem obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_8H_{10}N_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo jemné bílé krystalky snadno sublimující. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v etheru. Rozpouští se v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 234 C až 239 C; stanoví se s látkou vysušenou při 100 C až 105 C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kofeinu CRL;* stanoví se s látkou vysušenou při 100 C až 105 C.

C. Ke 2 ml nasyceného roztoku se přidá 0,05 ml *jodu RS;* roztok zůstane čirý. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS;* vznikne hnědá sraženina. Po zneutralizování *hydroxidem sodným zředěným RS* se sraženina rozpouští.

D. Asi 10 mg se ve zkumavce se skleněnou zátkou rozpustí v 0,25 ml směsi 0,5 ml *acetylacetonu R* a 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Zahřívá se ve vodní lázni 7 min při 80 C. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS2* a znovu se zahřívá ve vodní lázni 7 min při 80 C. Nechá se ochladit, přidá se 10 ml *vody R;* vzniká intenzivní modré zbarvení.

E. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

F. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí zahřátím v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R*, ochladí se a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je zelený nebo žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, acetonu R, chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 7,5 ml základního *roztoku síranů (10 μg* SO_4 */ml)* a 7,5 ml *vody destilované R.*

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 5,0 % až 9,0 %; 1,000 g se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Vysušená látka se použije ve zkoušce Stanovení obsahu.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,170 g látky ze zkoušky Ztráta sušením se rozpustí zahřátím v 5 ml *kyseliny octové bezvodé R.* Nechá se ochladit, přidá se 10 ml *acetanhydridu R,* 20 ml *toluenu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

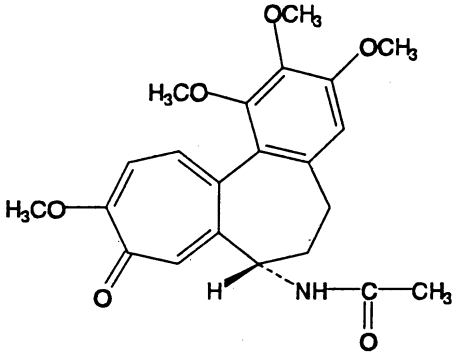
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,42 mg $C_8H_{10}N_4O_2$.

Uchovávání

Separandum.

†† Colchicinum

Kolchicin



$C_{22}H_{25}NO_6$ M_r 399,44 CAS 64-86-8

Je to (*S*)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo[*a*]heptalen-7-yl)acetamid. Počítáno na bezvodou a ethylacetatu prostou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{22}H_{25}NO_6$.

Vlastnosti

Nažloutle bílý amorfní nebo krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, z koncentrovaných roztoků rychle rekrystalizuje jako seskvihydrát, snadno rozpustný v lihu 96% a v chloroformu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 5 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 25,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 400 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 243 nm a 350 nm. Poměr absorbance naměřené při 243 nm k absorbanci naměřené při 350 nm je 1,7 až 1,9.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *kolchicinu CRL.* Tableta zkoušené látky a tableta referenční látky se připraví takto: látky se odděleně rozpustí v 0,5 ml *chloroformu R*, roztoky se pokropí *bromidem draselným R*, důkladně se promíchá, rozpouštědlo se odpaří nejprve v proudu vzduchu a pak zahříváním 60 min při 80 C.

C. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,15 ml *chloridu železitého RS1;* roztok je žlutý a povařením po dobu 30 s přechází na tmavě zelený. Ochladí se, přidají se 2 ml *chloroformu R* a protřepe se; organická vrstva je zelenožlutá.

D. Asi 30 mg se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,15 ml *chloridu železitého RS1;* vzniká hnědočervené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $ZŽ_3$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Roztok buď nezmění barvu, nebo se zbarvení změní na zelené. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -235° až -250°, počítáno na bezvodou a ethylacetatu prostou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 50,0 mg v *lihu 96% R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R. Zkouška se provede za ochrany před světlem. Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, dichlorethanu R* a *acetonu R* (1 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Chloroform. Nejvýše 500 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií metodou head space *(2.2.28, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 0,400 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Do tří vhodných stejných lahviček (lahvičky k opakovanému odběru) se převede 1,0 ml tohoto roztoku a lahvičky se uzavřou.
Porovnávací roztok. 5 μl *chloroformu R* se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Do tří vhodných stejných lahviček se převede po 10 μl tohoto roztoku, přidá se 1,0 ml zkoušeného roztoku a lahvičky se uzavřou.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony z křemenného skla délky 50 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřní stěnou pokrytou filmem (5 μm) chemicky vázaného *polydimethylsiloxanu R,*
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 4 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Programovaná teplota kolony je od 80 °C do 200 °C s nárůstem 10 °C/min, teplota detektoru se udržuje na 250 °C.

Každý roztok se zahřívá 20 min při 90 °C, na 30 s se zvýší tlak a převede se do kolony při teplotě 120 °C. Provede se slepá zkouška s lahvičkou obsahující 1 ml *vody R*. Každý nástřik se provede třikrát.

Z chromatogramů zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku se vypočítá obsah chloroformu v procentech za použití jeho hustoty *(2.2.5)*, která činí 1,48 g/cm^3 při 20 °C.

Kolchicein. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml. Přidá se 0,1 ml *chloridu železitého RS1*. Roztok není intenzivněji zbarven než směs 1 ml základního červeného roztoku, 2 ml základního žlutého roztoku a 2 ml základního modrého roztoku *(2.2.2)* (asi 0,2 %).

Ethylacetat. Nejvýše 6,0 %; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *ethanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 ml *ethanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 5,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml *ethylacetatu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné nebo ocelové nerezové kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 10 % *makrogolu 1000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 75 C, teplota nástřikového prostoru na 130 C, teplota detektoru na 150 C.

Z chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku se vypočítá obsah ethylacetatu v procentech za použití jeho hustoty *(2.2.5)*, která činí 0,901 g/cm^3 při 20 C.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí za mírného zahřátí ve směsi 10 ml *acetanhydridu R* a 20 ml *toluenu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 39,94 mg $C_{22}H_{25}NO_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

†† Colecalciferoli pulvis

Upravený práškovaný cholekalciferol

Synonymum. Cholecalciferoli pulvis

Je to disperze olejového roztoku cholekalciferolu do vhodné základní látky obsahující želatinu a cukry.

Deklarovaný obsah cholekalciferolu je nejméně 100 000 m.j. na 1 gram. Obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarovaného obsahu. Může obsahovat vhodné stabilizátory, např. antioxidanty.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý prášek, jehož malé částice v závislosti na přípravě mohou být prakticky nerozpustné ve vodě, mohou bobtnat nebo tvořit disperzi.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A a B, viz Obecné zásady (1.2).

A. 5,0 ml zkoušeného roztoku připraveného pro Stanovení obsahu se odpaří ve vhodné nádobě do sucha za sníženého tlaku a otáčení ve vodní lázni při 40 °C. Po ochlazení pod tekoucí vodou se obnoví atmosférický tlak *dusíkem R*. Zbytek se ihned rozpustí v 50,0 ml *cyklohexanu R* a měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 265 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Následující roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 10,0 ml zkoušeného roztoku připraveného pro Stanovení obsahu se ve vhodné nádobě odpaří do sucha za sníženého tlaku a otáčení ve vodní lázni při 40 °C. Po ochlazení pod tekoucí vodou se obnoví atmosférický tlak *dusíkem R*. Zbytek se ihned rozpustí v 0,4 ml *dichlorethanu R* obsahujícího *skvalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l).
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cholekalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *ergokalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R*. Směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *kyselinou sírovou R*. Porovná se hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku s hlavními skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ihned po postřiku patrna jasně žlutá hlavní skvrna rychle měnící zbarvení na oranžově hnědé a postupně na zelenošedé, stálé asi 10 min. Tato skvrna je polohou, zbarvením a velikostí shodná se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je ve stejné poloze hlavní skvrna, jejíž oranžové zbarvení se postupně mění na červenohnědé, stálé asi 10 min.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku má shodný retenční čas s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Rozkladné produkty vzniklé zářením. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*. Následující roztoky se připraví bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. Použije se zkoušený roztok ze zkoušky totožnosti B.
Porovnávací roztok. Použije se čerstvě připravený porovnávací roztok (a) ze zkoušky totožnosti B.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se okamžitě za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R*. Směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva třikrát

postříká *chloridem antimonitým RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku má zpočátku oranžové zbarvení, které pak přechází na hnědé (cholekalciferol); tato skvrna je polohou, barvou a velikostí shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je také patrna těsně nad hlavní skvrnou další skvrna stejného zbarvení odpovídající pre-cholekalciferolu, který je v roztoku v rovnováze s cholekalciferolem. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrna šedavě modrá skvrna na startu ani na dráze směrem k hlavní skvrně.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede co nejrychleji a pokud možno za chránění před světlem a vzduchem.

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Do baňky se vpraví množství zkoušeného přípravku, odvážené s přesností 0,1 %, odpovídající asi 100 000 m.j. Přidá se 5 ml *vody R*, 20 ml *ethanolu R*, 1 ml *askorbanu sodného RS* a 3 ml čerstvě připraveného 50% roztoku *hydroxidu draselného R*. Zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem a rychle se ochladí pod tekoucí vodou. Tekutina se převede do dělicí nálevky pomocí dvakrát 15 ml *vody R*, 10 ml *lihu 96% R* a dvakrát 50 ml *pentanu R*. Silně se třepe 30 s a nechá se stát, dokud se vrstvy nevyčeří. Spodní vodně-lihová vrstva se přenese do druhé dělicí nálevky a třepe se směsí 10 ml *lihu 96% R* a 50 ml *pentanu R*. Po oddělení vrstev se vodně-lihová vrstva převede do třetí dělicí nálevky a pentanová vrstva se převede do první dělicí nálevky, přičemž se druhá dělicí nálevka promyje dvakrát 10 ml *pentanu R* a ten se přidá do první dělicí nálevky. Vodně-lihová vrstva se protřepe s 50 ml *pentanu R* a pentanová vrstva se rovněž převede do první dělicí nálevky. Spojené pentanové vrstvy se promyjí dvakrát 50 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu R* 10% (*V/V*). Pentanová vrstva se silně protřepává opakovaně 50 ml *vody R* tak dlouho, až promývací voda dává neutrální reakci na fenolftalein. Pentanová vrstva se převede do baňky se zabroušenou zátkou, odpaří se do sucha za sníženého tlaku a otáčení ve vodní lázni 40 °C teplé. Potom se ochladí pod tekoucí vodou a atmosférický tlak se vyrovná *dusíkem R*. Zbytek se ihned rozpustí v 5,0 ml *toluenu R* a přidá se 20,0 ml mobilní fáze, aby se získal roztok obsahující asi 4000 m.j. v 1 ml.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,5 g *cholekalciferolu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem po dobu 45 min a ochladí se.

Porovnávací roztok (c). 0,10 g *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí mobilní fází na 50,0 ml. Roztok se udržuje ve vodě s ledem.

Porovnávací roztok (e). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se převede do odměrné baňky na 50 ml, přidá se asi 10 mg *butylhydroxytoluenu R* a odstraní se vzduch z baňky *dusíkem R*. Zahřívá se ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem pod *dusíkem R* a za chránění před světlem po dobu 45 min. Po ochlazení se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm a naplněné vhodným silikagelem (5 μm až 10 μm),
- směsi objemových dílů *pentanolu R* a *hexanu R* (3 + 997) jako mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se pomocí automatického dávkovače nebo pomocí injektorové smyčky vhodný objem porovnávacího roztoku (b), zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro pík cholekalciferolu byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nástřik se opakuje šestkrát. Pokud jsou dodrženy předepsané podmínky, je přibližný relativní retenční čas pro pre-cholekalciferol 0,4, pro *trans*-cholekalciferol 0,5 a pro cholekalciferol 1,0.

Relativní směrodatná odchylka odezvy pro cholekalciferol není větší než 1 % a rozlišení pro pre-cholekalciferol a *trans*-cholekalciferol není menší než 1,0; je-li třeba, upraví se složení a průtoková rychlost mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo uvedeného rozlišení.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (d) a zaznamená se chromatogram. Nastříkne se stejný objem porovnávacího roztoku (e) a zaznamená se chromatogram. Vypočítá se přepočítací faktor (*f*) podle vzorce:

$$f = \frac{K - L}{M},$$

v němž značí:
K - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d),
L - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e),
M - plochu (nebo výšku) píku pre-cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Hodnota *f* stanovená dvakrát v různé dny může být použita během celého postupu.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (a) a zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro cholekalciferol byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nastříkne se stejný objem zkoušeného roztoku a zaznamená se chromatogram stejným způsobem. Obsah cholekalciferolu v mezinárodních jednotkách na gram se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m'}{V'} \cdot \frac{V}{m} \cdot \frac{S_D + (f \cdot S_p)}{S'_D} \cdot 40\ 000 \cdot 1000,$$

v němž značí:
m - hmotnost látky ve zkoušeném roztoku v miligramech,
m' - hmotnost *cholekalciferolu CRL* v porovnávacím roztoku (a) v miligramech,
V - objem zkoušeného roztoku (25 ml),
V' - objem porovnávacího roztoku (a) (100 ml),
S_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S'_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
S_p - plochu (nebo výšku) píku pre-cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
f - přepočítací faktor.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných dobře naplněných obalech, chráněn před světlem a při teplotě 6 °C až 15 °C. Obsah otevřených obalů se použije co nejdříve; nespotřebovaná část se uchovává v atmosféře dusíku.

Venenum.

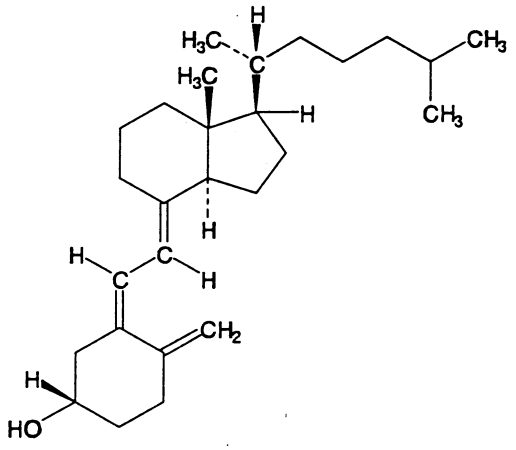
Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek na gram,
- název a nejvyšší koncentrace přidaných stabilizátorů.

†† Colecalciferolum

Cholekalciferol

Synonyma. Cholecalciferolum, vitamin D_3



$C_{27}H_{44}O$ $_r$ 384,64 CAS 67-97-0

Je to (5*Z*,7*E*)-9,10-seko-5,7,10(19)-cholestatrien-3ß-ol. Obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{27}H_{44}O$.

1 mg cholekalciferolu odpovídá svým antirachitickým účinkem na krysách 40 000 m.j. vitaminu D.

Vlastnosti

Bílé nebo téměř bílé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustný v mastných olejích. Vlivem vzduchu, tepla a světla se rozkládá. Roztoky v těkavých rozpouštědlech jsou nestálé, mají se připravovat v čas potřeby.

Reverzibilní izomerizace na pre-cholekalciferol v roztocích probíhá v závislosti na teplotě a času.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 82 °C až 87 °C; stanoví se bez upráškování nebo sušení.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem *cholekalciferolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce 7-Dehydrocholesterol, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je polohou, velikostí a zbarvením shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +105° až +112°; měří se roztok v 2dm trubici do 30 min po následující přípravě: 0,200 g se rychle a bez zahřívání rozpustí v *lihu 96% prostém aldehydů R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 50,0 mg se rychle a bez zahřívání rozpustí v *lihu 96% prostém aldehydů R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% prostým aldehydů R* na 250,0 ml. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 50,0 mg *cholekalciferolu CRL* a měří se absorbance obou roztoků v maximu při 265 nm do 30 min po přípravě roztoků. Absorbance zkoušeného roztoku se liší od absorbance porovnávacího roztoku nejvýše o 3 %. Zkoušku lze hodnotit, jestliže měřená absorbance je 0,46 až 0,50.

7-Dehydrocholesterol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Roztoky dále uvedené se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *dichlorethanu R*, který obsahuje *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *cholekalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R*, který obsahuje *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), a zředí se jím na 4 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *7-dehydrocholesterolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R*, který obsahuje *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). Smíchají se stejné objemové díly porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se odděleně nanese 10 μl zkoušeného roztoku, 10 μl porovnávacího roztoku (a), 10 μl porovnávacího roztoku (b) a 20 μl porovnávacího roztoku (c). Vyvíjí se za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R*, směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva třikrát postříká *chloridem antimonitým RS1*. Chromatogramy se hodnotí za 3 min až 4 min po postříkání. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je zpočátku oranžově žlutá a potom její zbarvení přechází na hnědé. Těsně pod hlavní skvrnou eventuálně přítomná fialová skvrna (7-dehydrocholesterol) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou patrny jiné skvrny, než které jsou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede co nejrychleji za chránění před světlem a vzduchem.
Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí bez zahřívání v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 g *cholekalciferolu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem po dobu 45 min a ochladí se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné vhodným silikagelem (5 μm až 10 μm),
- směsi objemových dílů *pentanolu R* a *hexanu R* (3 + 997) jako mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se pomocí automatického dávkovače nebo pomocí injektorové smyčky vhodný objem porovnávacího roztoku (b), zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro pík cholekalciferolu byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nástřik se opakuje šestkrát. Pokud jsou dodrženy předepsané podmínky, je přibližný relativní retenční čas pro pre-cholekalciferol 0,4, pro *trans*-cholekalciferol 0,5 a pro cholekalciferol 1,0.

Relativní směrodatná odchylka odezvy pro cholekalciferol není větší než 1 % a rozlišení pro pre-cholekalciferol a *trans*-cholekalciferol není menší než 1,0; je-li třeba, upraví se složení a průtoková rychlost mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo uvedeného rozlišení.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (a) a zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro cholekalciferol byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nastříkne se stejný objem zkoušeného roztoku a zaznamená se chromatogram stejným způsobem. Obsah cholekalciferolu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m'}{m} \cdot \frac{S_D}{S'_D} \cdot 100,$$

v němž značí:
m - hmotnost látky ve zkoušeném roztoku v miligramech,
m' - hmotnost *cholekalciferolu CRL* v porovnávacím roztoku (a) v miligramech,
S_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S'_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech v atmosféře dusíku, chráněn před světlem, při teplotě mezi 2 °C až 8 °C. Obsah otevřených obalů se ihned spotřebuje.

Venenum.

†† Colecalciferolum densatum oleosum

Olejový roztok cholekalciferolu

Synonymum. Cholecalciferolum densatum oleosum

Je to roztok cholekalciferolu ve vhodném rostlinném oleji. Deklarovaný obsah cholekalciferolu je nejméně 500 000 m.j. na 1 gram. Roztok obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarovaného obsahu. Může obsahovat vhodné stabilizátory, např. antioxidanty.

Vlastnosti

Čirá žlutá tekutina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu, mísitelný s rozpouštědly tuků. V závislosti na teplotě se může částečně vyskytnout pevná hmota.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, viz Obecné zásady (1.2).

A. Připraví se roztok v *cyklohexanu R* obsahující množství odpovídající asi 400 m.j. na mililitr a měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 267 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Roztoky dále uvedené se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. Množství odpovídající 400 000 m.j. se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml. *Porovnávací roztok (a).* 10 mg *cholekalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml. *Porovnávací roztok (b).* 10 mg *ergokalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 l každého roztoku a vyvíjí se ihned za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R.* Směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *kyselinou sírovou R.* Porovná se hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku s hlavními skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je okamžitě patrna jasně žlutá hlavní skvrna rychle měnící zbarvení na oranžově hnědé a postupně na zelenošedé, stálé asi 10 min. Tato skvrna je polohou, barvou a velikostí shodná se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je ihned patrná ve stejné poloze hlavní skvrna, jejíž oranžové zbarvení se postupně mění na červenohnědé, stálé asi 10 min.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku má shodný retenční čas s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g rozpuštěnými v 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 20.

Rozkladné produkty vzniklé ozářením. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. Použije se zkoušený roztok ze zkoušky B.
Porovnávací roztok. Použije se porovnávací roztok (a) ze zkoušky B.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se okamžitě za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R*. Směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva třikrát postříká *chloridem antimonitým RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku má zpočátku oranžové zbarvení, které pak přechází na hnědé (cholekalciferol); tato skvrna je polohou, barvou a velikostí shodná se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je také patrna těsně nad hlavní skvrnou další skvrna stejného zbarvení odpovídající pre-cholekalciferolu, který je v roztoku v rovnováze s cholekalciferolem, a není zde patrna šedavě modrá skvrna na startu ani na dráze směrem k hlavní skvrně.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede co nejrychleji a pokud možno za chránění před světlem a vzduchem.
Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Množství zkoušeného přípravku, odvážené s přesností 0,1 %, odpovídající asi 400 000 m.j. se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 g *cholekalciferolu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem po dobu 45 min a ochladí se.
Porovnávací roztok (c). 0,10 g *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí mobilní fází na 50,0 ml. Roztok se udržuje ve vodě s ledem.
Porovnávací roztok (e). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se převede do odměrné baňky, přidá se asi 10 mg *butylhydroxytoluenu R* a odstraní se vzduch z baňky *dusíkem R*. Zahřívá se ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem pod *dusíkem R* a za chránění před světlem po dobu 45 min. Po ochlazení se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné vhodným silikagelem (5 μm až 10 μm),
- směsi objemových dílů *pentanolu R* a *hexanu R* (3 + 997) jako mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se pomocí automatického dávkovače nebo pomocí injektorové smyčky vhodný objem porovnávacího roztoku (b), zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro

pík cholekalciferolu byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nástřik se opakuje šestkrát. Pokud jsou dodrženy předepsané podmínky, je relativní retenční čas pro pre-cholekalciferol 0,4, pro *trans*-cholekalciferol 0,5 a pro cholekalciferol 1,0.

Relativní směrodatná odchylka odezvy pro cholekalciferol není větší než 1 % a rozlišení pro pre-cholekalciferol a *trans*-cholekalciferol není menší než 1,0; je-li třeba, upraví se složení a průtoková rychlost mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo uvedeného rozlišení.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (d) a zaznamená se chromatogram. Nastříkne se stejný objem porovnávacího roztoku (e) a zaznamená se chromatogram. Vypočítá se přepočítací faktor (*f*) podle vzorce:

$$f = \frac{K - L}{M},$$

v němž značí:
K - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d),
L - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e),
M - plochu (nebo výšku) píku pre-cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Hodnota *f* stanovená dvakrát v různé dny může být použita během celého postupu.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (a) a zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro cholekalciferol byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nastříkne se stejný objem zkoušeného roztoku a zaznamená se chromatogram stejným způsobem. Obsah cholekalciferolu v mezinárodních jednotkách na gram se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m'}{V'} \cdot \frac{V}{m} \cdot \frac{S_D + (f \cdot S_p)}{S'_D} \cdot 40\ 000 \cdot 1000,$$

v němž značí:
m - hmotnost přípravku ve zkoušeném roztoku v miligramech,
m' - hmotnost *cholekalciferolu CRL* v porovnávacím roztoku (a) v miligramech,
V - objem zkoušeného roztoku (100 ml),
V' - objem porovnávacího roztoku (a) (100 ml),
S_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S'_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
S_p - plochu (nebo výšku) píku pre-cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
f - přepočítací faktor.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných dobře naplněných obalech, chráněn před světlem a při teplotě 6 °C až 15 °C. Obsah otevřených obalů se použije co nejdříve; nespotřebovaná část se uchovává v atmosféře dusíku.

Venenum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek na gram,

- metoda převedení do roztoku částečně vzniklé pevné hmoty,
- název a nejvyšší koncentrace přidaného stabilizátoru.

†† Colecalciferolum in aqua dispergibile

Vodná disperze cholekalciferolu

Synonymum. Cholecalciferolum in aqua dispergibile

Je to vodná disperze roztoku cholekalciferolu ve vhodném rostlinném oleji s přídavkem solubilizátoru.

Deklarovaný obsah cholekalciferolu je minimálně 100 000 m.j. na 1 gram. Obsahuje 90,0 % až 115,0 % deklarovaného obsahu. Může obsahovat vhodné stabilizátory, např. antioxidanty.

Vlastnosti

Slabě nažloutlá tekutina proměnlivé opalescence a viskozity. Koncentrovaný přípravek se může zakalit při nízkých teplotách anebo tvořit gel při pokojové teplotě.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 5,0 ml zkoušeného roztoku připraveného ve zkoušce Stanovení obsahu se odpaří ve vhodné nádobě do sucha za sníženého tlaku a otáčení ve vodní lázni při 40 °C. Po ochlazení pod tekoucí vodou se obnoví atmosférický tlak *dusíkem R*. Zbytek se ihned rozpustí v 50,0 ml *cyklohexanu R* a měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 265 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Roztoky dále uvedené se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 10,0 ml zkoušeného roztoku připraveného ve zkoušce Stanovení obsahu se ve vhodné nádobě odpaří do sucha za sníženého tlaku a otáčení ve vodní lázni při 40 °C. Po ochlazení v tekoucí vodě se obnoví atmosférický tlak *dusíkem R*. Zbytek se ihned rozpustí v 0,4 ml *dichlorethanu R* obsahujícího *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l).
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cholekalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *ergokalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R* obsahujícím *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 4,0 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R*. Směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *kyselinou sírovou R*. Porovná se hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku s hlavními skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna jasně žlutá hlavní skvrna rychle měnící zbarvení na oranžově hnědé a postupně na zelenošedé, stálé asi 10 min. Tato skvrna je polohou, barvou a velikostí shodná se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu porovná-

vacího roztoku (b) je ve stejné poloze hlavní skvrna, jejíž oranžové zbarvení se postupně mění na červenohnědé, stálé asi 10 min.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku má shodný retenční čas s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 1 g se smíchá s 10 ml *vody R* zahřáté na 50 °C a ochladí se na 20 °C. Bezprostředně po ochlazení se tvoří stejnorodá slabá opalescence a slabě žlutá disperze.

Zkoušky na čistotu

Rozkladné produkty vzniklé ozářením. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Roztoky níže uvedené se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. Použije se roztok připravený stejně jako zkoušený roztok ze zkoušky totožnosti B. *Porovnávací roztok.* Použije se porovnávací roztok (a) ze zkoušky totožnosti B.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned za chránění před světlem po dráze 15 cm směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidů R.* Směs obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l). Po vysušení na vzduchu se vrstva třikrát postříká *chloridem antimonitým RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku má zpočátku oranžové zbarvení, které pak přechází na hnědé (cholekalciferol); tato skvrna je polohou, barvou a velikostí shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je také patrna těsně nad hlavní skvrnou další skvrna stejného zbarvení odpovídající pre-cholekalciferolu, který je v roztoku v rovnováze s cholekalciferolem, a není zde patrna šedavě modrá skvrna na startu ani na dráze směrem k hlavní skvrně.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede co nejrychleji a pokud možno za chránění před světlem a vzduchem.

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Do baňky se vpraví množství zkoušeného přípravku, odvážené s přesností 0,1 %, odpovídající asi 100 000 m.j. Přidá se 5 ml *vody R*, 20 ml *ethanolu R*, 1 ml *askorbanu sodného RS* a 3 ml čerstvě připraveného 50% roztoku *hydroxidu draselného R.* Zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem a rychle se ochladí pod tekoucí vodou. Tekutina se převede do dělicí nálevky pomocí dvakrát 15 ml *vody R*, 10 ml *lihu 96% R* a dvakrát 50 ml *pentanu R.* Silně se třepe 30 s a nechá se stát, dokud se vrstvy nevyčeří. Spodní vodně-lihová vrstva se přenese do druhé dělicí nálevky a třepe se směsí 10 ml *lihu 96% R* a 50 ml *pentanu R.* Po oddělení vrstev se vodně-lihová vrstva převede do třetí dělicí nálevky a pentanová vrstva se převede do první dělicí nálevky, přičemž se druhá dělicí nálevka promyje dvakrát 10 ml *pentanu R* a ten se přidá do první dělicí nálevky. Vodně-lihová vrstva se protřepe s 50 ml *pentanu R* a pentanová vrstva se rovněž převede do první dělicí nálevky. Spojené pentanové vrstvy se promyjí dvakrát silným protřepáním s 50 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu R* 10% (*V/V*). Pentanová vrstva se opakovaně silně protřepává 50 ml *vody R* tak dlouho, až promývací voda dává neutrální reakci na fenolftalein. Pentanová vrstva se převede do baňky se zabroušenou zátkou, odpaří se do sucha za sníženého tlaku a otáčení ve vodní lázni 40 °C teplé. Potom se ochladí pod tekoucí vodou a atmosférický tlak se vyrovná *dusíkem R.* Zbytek se ihned rozpustí v 5,0 ml *toluenu R* a přidá se 20,0 ml mobilní fáze, aby se získal roztok obsahující asi 4000 m.j. v 1 ml.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 g *cholekalciferolu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem po dobu 45 min a ochladí se.
Porovnávací roztok (c). 0,10 g *cholekalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí mobilní fází na 50,0 ml. Roztok se udržuje ve vodě s ledem.
Porovnávací roztok (e). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se převede do odměrné baňky na 50,0 ml, přidá se 10 mg *butylhydroxytoluenu R* a odstraní se vzduch z baňky *dusíkem R*. Zahřívá se ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem pod *dusíkem R* a za chránění před světlem po dobu 45 min. Po ochlazení se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné vhodným silikagelem (5 μm až 10 μm),
- směsi objemových dílů *pentanolu R* a *hexanu R* (3 + 997) jako mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se pomocí automatického dávkovače nebo pomocí injektorové smyčky vhodný objem porovnávacího roztoku (b), zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro pík cholekalciferolu byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nástřik se opakuje šestkrát. Pokud jsou dodrženy předepsané podmínky, je přibližný relativní retenční čas pro pre-cholekalciferol 0,4, pro *trans*-cholekalciferol 0,5 a pro cholekalciferol 1,0.

Relativní směrodatná odchylka odezvy pro cholekalciferol není větší než 1 % a rozlišení pro pre-cholekalciferol a *trans*-cholekalciferol není menší než 1,0; je-li třeba, upraví se složení a průtoková rychlost mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo uvedeného rozlišení.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (d) a zaznamená se chromatogram. Nastříkne se stejný objem porovnávacího roztoku (e) a zaznamená se chromatogram. Vypočítá se přepočítací faktor (*f*) podle vzorce:

$$f = \frac{K - L}{M},$$

v němž značí:
K - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d),
L - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e),
M - plochu (nebo výšku) píku pre-cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Hodnota *f* stanovená dvakrát v různé dny může být použita během celého postupu.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (a) a zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro cholekalciferol byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nastříkne se stejný objem zkoušeného roztoku a zaznamená se chromatogram stejným způsobem.

Obsah cholekalciferolu v mezinárodních jednotkách na gram se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m'}{V'} \cdot \frac{V}{m} \cdot \frac{S_D + (f \cdot S_p)}{S'_D} \cdot 40\ 000 \cdot 1000,$$

v němž značí:
m - hmotnost přípravku ve zkoušeném roztoku v miligramech,
m' - hmotnost *cholekalciferolu CRL* v porovnávacím roztoku (a) v miligramech,
V - objem zkoušeného roztoku (25 ml),
V' - objem porovnávacího roztoku (a) (100 ml),
S_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S'_D - plochu (nebo výšku) píku cholekalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
S_p - plochu (nebo výšku) píku pre-cholekalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
f - přepočítací faktor.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných dobře naplněných obalech, chráněna před světlem a při teplotě uvedené v označení na obalu. Obsah otevřených obalů se použije co nejdříve; nespotřebovaná část se uchovává v atmosféře inertního plynu, např. dusíku.

Venenum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek na gram,
- název hlavního použitého solubilizátoru nebo solubilizátorů a název a nejvyšší koncentrace přidaných stabilizátorů,
- teplota uchovávání.

† Colistimethatum natricum

Sodná sůl kolistimethatu

Je to antibiotikum připravené reakcí kolistinu s formaldehydem a hydrogensiřičitanem sodným. Účinnost je nejméně 11 500 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v acetonu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R.* Zahřívá se 5 h v utěsněné zkumavce při 135 °C. Odpaří se do sucha na vodní lázni a pokračuje se v zahřívání do vymizení pachu po kyselině chlorovodíkové. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *vody R.*

Porovnávací roztok (a). 20 mg *leucinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 20 mg *threoninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (c). 20 mg *fenylalaninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (d). 20 mg *serinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Další postup zkoušky se provede za chránění před světlem.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku do 10mm proužků. V chromatografické komoře se deska umístí tak, aby nepřišla do styku s mobilní fází skládající se ze směsi 25 dílů *vody R* a 75 dílů *fenolu R.* Deska se nejméně 12 h impregnuje parami mobilní fáze. Vyvíjí se toutéž mobilní fází po dráze 12 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a postříká se *ninhydrinem RS1.* Zahřívá se 5 min při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b), nejsou tam skvrny odpovídající skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (c) a (d), navíc je přítomna skvrna s velmi nízkou hodnotou R_F (kyselina 2,4-diaminomáselná).

B. Asi 5 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R*, přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, protřepe se a přidá se 0,5 ml roztoku *síranu měďnatého R* (10 g/l); vznikne fialové zbarvení.

C. Asi 50 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a přidá se 0,5 ml *jodu 0,01 mol/l RS.* Roztok se odbarví a vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

D. Vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,16 g se rozpustí v 10 ml *vody R.* Roztok je čirý (*2.2.1*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,2 až 7,7. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -46° až -51°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Volný kolistin. 80 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R.* Přidá se 0,1 ml roztoku *kyseliny křemičitowolframové R* (100 g/l); 10 s až 20 s po přidání zkoumadla neopalizuje roztok silněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*).

Celkový obsah siřičitanů. *Zkouška se provádí v digestoři.*

0,100 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a přidá se 5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l) a 0,3 g *kyanidu draselného R.* Vaří se mírně 3 min, pak se ochladí a neutralizuje *kyselinou sírovou 0,5 mol/l RS* za použití 0,2 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru. Přidá se 0,5 ml kyseliny v nadbytku a 0,2 g *jodidu draselného R.* Titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Spotřeba *jodu 0,05 mol/l VS* je 5,5 ml až 7,0 ml.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,5 %; 1,000 g se suší 3 h při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). 16 % až 21 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku ve *vodě na injekci R* obsahujícího 2,5 mg zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

† Colistini sulfas

Kolistiniumsulfat

Je to směs síranů polypeptidů produkovaných určitými kmeny mikroorganismu *Bacillus polymyxa var. colistinus* nebo získaná jiným způsobem. Účinnost je nejméně 19 000 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*. Zahřívá se 5 h v utěsněné zkumavce při 135 C. Odpaří se do sucha na vodní lázni a pokračuje se v zahřívání do vymizení pachu po kyselině chlorovodíkové. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *vody R*.

Porovnávací roztok (a). 20 mg *leucinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 20 mg *threoninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *fenylalaninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 20 mg *serinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Další postup zkoušky se provede za chránění před světlem.

Na vrstvu se nanese odděleně 5 μl každého roztoku do 10mm proužku. V chromatografické komoře se deska umístí tak, aby nepřišla do styku s mobilní fází skládající se ze směsi 25 dílů *vody R* a 75 dílů *fenolu R*. Deska se nejméně 12 h impregnuje parami mobilní fáze. Vyvíjí se toutéž mobilní fází po dráze 12 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b), nejsou tam skvrny odpovídající skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (c) a (d), navíc je přítomna skvrna s velmi nízkou hodnotou R_F (kyselina 2,4-diaminomáselná).

B. Asi 5 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R*, přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, protřepe se a přidá se 0,5 ml roztoku *síranu měďnatého R* (10 g/l); vznikne fialové zbarvení.

C. Asi 50 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a přidá se 0,5 ml *jodu 0,01 mol/l RS*. Roztok zůstane zbarvený.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 6,0. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -63° až -73°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 3,5 %; 1,00 g se suší 3 h při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Sírany. 16,0 % až 18,0 %, počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a pH roztoku se upraví *amoniakem 26% R* na 11. Přidá se 10 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l RS* a asi 0,5 mg *červeně ftaleinové R*. Titruje se *chelatonem 0,1 mol/l VS*, a jakmile se začne měnit barva roztoku, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci až do vymizení fialově modré barvy.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

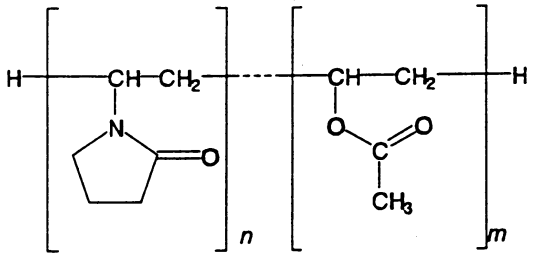
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Copovidonum

Kopovidon

Synonymum. Copolyvidonum



$(C_6H_9NO)_n + (C_4H_6O_2)_m$ M_r $(111,1)_n + (86,1)_m$ CAS 8013-98-7

Je to kopolymer 1-vinyl-2-pyrrolidonu a vinylacetatu v hmotnostním poměru 3 : 2. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 7,0 % až 8,0 % dusíku a 35,3 % až 42,0 % vinylacetatové složky. K-hodnota je 90,0 % až 110,0 % deklarované hodnoty.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý hygroskopický prášek nebo vločky. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kopovidonu*.

B. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 5 ml *vody R* a 0,2 ml *jodu 0,05 mol/l VS;* vznikne červené zbarvení.

C. 0,7 g *hydroxylamoniumchloridu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*, přidá se 20 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a v případě potřeby se zfiltruje. K 5 ml roztoku se přidá 0,1 g zkoušené látky a 2 min se vaří. 0,05 ml se přenese na filtrační papír a přidá se 0,1 ml směsi stejných objemových dílů *chloridu železitého RS1* a *kyseliny chlorovodíkové R;* vznikne fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Zkoušená látka se přidává do *vody R* po malých dávkách za stálého míchání.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_5, $Č_5$ nebo $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Aldehydy. K 20,0 g se do kuželové baňky se zabroušenou zátkou přidá 180 ml *vody R*, vaří se 45 min pod zpětným chladičem a nechá se ochladit. Roztok se destiluje a asi 60 ml destilátu se jímá do 20,0 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (70 g/l) chlazeného ve vodě s ledem a s předem upraveným pH na hodnotu 3,1 *hydroxidem sodným 1 mol/l RS*. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. K dosažení pH 3,1 se spotřebuje nejvýše 9,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* (0,2 % vyjádřeno jako acetaldehyd). Provede se slepá zkouška.

Peroxidy. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 25 ml, přidají se 2 ml *zkoumadla chlorid titanitý--kyselina sírová R* a nechá se 30 min stát. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 405 nm za použití směsi 25 ml roztoku zkoušené látky (40 g/l) a 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* 13% *(V/V)* jako kontrolní tekutiny. Absorbance není větší než 0,35 (400 μg/g, vyjádřeno jako H_2O_2).

Hydrazin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R. Použijí se čerstvě připravené roztoky.*

Zkoušený roztok. K 25 ml roztoku S se přidá 0,5 ml roztoku *salicylaldehydu R* (50 g/l) v *methanolu R*, promíchá se a zahřívá 15 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se přidají 2,0 ml *xylenu R*, 2 min se protřepává a odstředí se. Použije se čirý supernatant.
Porovnávací roztok. 9 mg *salicylaldazinu R* se rozpustí v *xylenu R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *xylenem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 10 µl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající salicylaldazinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1 μg/g hydrazinu).

Monomery. 5,0 g se rozpustí v 15 ml *methanolu R*, pomalu se přidá 20,0 ml *bromidu jodného RS* a nechá se 30 min stát chráněn před světlem za občasného promíchání. Přidá se 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku žlutého zbarvení a v titraci se po kapkách pokračuje do odbarvení. Provede se slepá zkouška. Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* je nejvýše 3,6 ml (0,4 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

K-hodnota. 5,0 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 50,0 ml, nechá se 1 h stát a stanoví se viskozita *(2.2.9)* při (25 ± 0,1) °C za použití viskozimetru č. 1 s minimální dobou průtoku 100 s.

K-hodnota se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{1{,}5\ .\ \log\eta - 1}{0{,}15 + 0{,}003\ .\ c} + \frac{\sqrt{300\ .\ c\ .\ \log\eta + (c + 1{,}5\ .\ c\ .\ \log\eta)^2}}{0{,}15\ .\ c\ +\ 0{,}003\ .\ c^2},$$

v němž značí:
c - obsah zkoušené látky v procentech (g/100 ml), počítáno na vysušenou látku,
η - relativní viskozitu roztoku.

Stanovení obsahu

Dusík. Provede se stanovení obsahu dusíku *(2.5.9)* s 30,0 mg zkoušené látky a s 1 g směsi 997 dílů *síranu draselného R* a 3 dílů *síranu měďnatého R*. Žíhá se ještě 45 min po vzniku čiré světle zelené tekutiny.

Vinylacetatová složka. Stanoví se číslo zmýdelnění *(2.5.6)* s 2,00 g zkoušené látky. Výsledek se násobí číslem 0,1534 a získá se obsah vinylacetatové složky vyjádřený v procentech.

Uchovávání

Chráněn před vlhkostí.

Označování

V označení na obalu se uvede K-hodnota.

Coriandri etheroleum

N

Koriandrová silice

Synonyma. Coriandri aetheroleum, Oleum coriandri

Je to silice získaná ze zralých plodů druhu *Coriandrum sativum* L. destilací s vodní parou. Obsahuje 60,0 % až 85,0 % volných i vázaných alkoholů, počítáno jako linalol ($C_{10}H_{18}O$; M_r 154,25).

Vlastnosti

Bezbarvá až slabě nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu a chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, s etherem a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *linalolu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,865 až 0,878.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,463 až 1,472.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +8° až +13°.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Nejvýše 0,150 g.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná ve třech objemových dílech *lihu R* 70% *(V/V)*.

Stanovení obsahu

5,0 ml se v kuželové baňce se zábrusem smíchá se 7,5 ml *směsi formylační dle Béhala R*, intenzivně se protřepe a baňka se ihned vloží do vody s ledem. Po 2 h se baňka vyjme a nechá se stát tři dny při obyčejné teplotě, v temnu. K 50 ml chladné *vody R* v dělicí nálevce se přidá formylovaná silice a intenzivně se protřepe. Po 2 h stání se vodná vrstva odstraní. Formylovaná silice se protřepává 50 ml *vody R*, pak 50 ml roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* (50 g/l) a dvakrát 50 ml *vody R;* vodná vrstva se vždy odstraní. Formylovaná silice se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se.

1,500 g formylované silice se smíchá se 3 ml *lihu 96% R* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a po kapkách se přidává *hydroxid draselný v lihu 0,5 mol/l VS* do trvalého zbarvení. Pak se přidá 35,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 90 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *modři thymolové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do trvalé změny zbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah volných i vázaných alkoholů v procentech, vyjádřeno jako linalol ($C_{10}H_{18}O$), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{a \cdot 7,712}{m - a \cdot 0,0014},$$

v němž značí:

a - rozdíl spotřeb *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* ve zkoušce a slepé zkoušce v mililitrech,

m - navážku formylované silice v gramech.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

† Corticotropinum

Kortikotropin

Je to látka, která se získává z předního laloku hypofýzy prasete. Obsahuje kortikotropní peptid, který zvyšuje sekreci kortikoidů v nadledvinách. Získaný materiál se zbaví nečistot a vysuší se vhodným způsobem. Účinnost je nejméně 70 m.j. v miligramu.

Výroba

Připravuje se v prostředí, které minimalizuje stupeň mikrobiálního znečištění.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek nebo vločky. Jeho roztok (10 g/l) je čirý nebo slabě opalizující.

Zkoušky totožnosti

A. Snižuje koncentraci kyseliny askorbové v nadledvinách po podání ve zkoušce Stanovení účinnosti (zkouška A nebo zkouška B).

B. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 1 mg se rozpustí v 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,05 mol/l RS.*
Porovnávací roztok. 1 mg *kortikotropinu CRL* se rozpustí v 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,05 mol/l RS.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 m),
- mobilních fází s průtokovou rychlostí 1 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 2,0,
  - *mobilní fáze B - acetonitril R*,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Kolona se uvede do rovnovážného stavu směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (20 + 80) a 5 min se zaznamenává chromatogram. Dále se provede gradientová eluce s lineárně rostoucím podílem mobilní fáze B na 40 objemových dílů o 0,33 % (*V/V*) za minutu po dobu 60 min. Nakonec se 15 min eluuje směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (20 + 80). Nastříkne se odděleně 100 l každého roztoku. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže asymetrie hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku je 0,8 až 2,0 a jestliže počet teoretických pater vypočtených pro hlavní pík je nejméně 1000.

C. Vyhodnotí se elektroforeogramy ze zkoušky Příbuzné bílkoviny. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku se poloha hlavní zóny shoduje s polohou hlavní zóny na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 5,0; měří se roztok (10 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R.*

Nečistoty vyšší molekulové hmotnosti než kortikotropin. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. 1 mg se rozpustí v 1 ml roztoku *kyseliny octové R* (60 g/l) obsahující *dodecylsíran sodný R* (10 g/l). Zahřívá se 10 min na 100 °C a nechá se zchladnout.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,85 m a vnitřního průměru 10 mm naplněné polyakrylamidem nebo dextranem síťovaným pro chromatografii s dělicí schopností pro peptidy o relativní molekulové hmotnosti přibližně 1000 až 10 000,
- mobilní fáze: roztok *kyseliny octové R* (60 g/l) o průtoku 7 ml/h,
- spektrofotometrického detektoru, 276 nm, se zapisovačem a s průtokovou kyvetou o objemu nejvýše 1 ml. Detektor a zapisovač se nastaví tak, aby rozsah stupnice zapisovače odpovídal 0,5 jednotky absorbance.

Kolona se uvede do rovnovážného stavu roztokem *kyseliny octové R* (60 g/l), nastříkne se 0,4 ml zkoušeného roztoku na 1 cm^2 plochy průřezu kolony a provede se eluce. Součet ploch všech píků eluovaných před hlavním píkem není větší než 5,0 % součtu ploch všech píků na chromatogramu.

Příbuzné bílkoviny. Provede se elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (*2.2.31*). Použije se sloupec gelu délky 80 mm a průměru 5 mm a *tlumivý roztok trometamol-glycinový o pH 8,3*. Elektroda v dolní zásobní nádobce tvoří anodu a v horní nádobce katodu.

Příprava gelu. Smíchají se 3 díly *vody R*, 3 díly roztoku obsahujícího ve 100 ml 28 g *akrylamidu R* a 0,735 g *methylenbisakrylamidu R* a 1 díl roztoku obsahujícího ve 100 ml 36,6 g *trometamolu R*, 0,23 ml *tetramethylethylendiaminu R* a 48,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Roztok se odplyní a přidá se 1 díl roztoku *peroxodisíranu diamonného R* (5,6 g/l).
Zkoušený roztok. 1 mg se rozpustí v 1 ml *tlumivého roztoku trometamol-glycinového o pH 8,3* a zředí se roztokem *sacharosy R* (400 g/l) na 2 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 mg *kortikotropinu CRL* se rozpustí v 1 ml *tlumivého roztoku trometamol-glycinového o pH 8,3* a zředí se roztokem *sacharosy R* (400 g/l) na 2 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *tlumivého roztoku trometamol-glycinového o pH 8,3* a roztoku *sacharosy R* (400 g/l) na 2 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *tlumivého roztoku trometamol-glycinového o pH 8,3* a roztoku *sacharosy R* (400 g/l) na 2 ml.

Na povrch gelu se odděleně nanese po 100 μl každého roztoku. Po přidání tlumivého roztoku se přidá 0,2 ml *modři bromfenolové RS*. Elektroforetický proces probíhá 30 min při konstantním proudu 1 mA na trubičku, dále 100 min při proudu 3 mA na trubičku. Gely se 1 h barví v roztoku *černi amido 10 B R* (10 g/l) v 7% roztoku (*V/V*) *kyseliny octové R*. Poté se gely 24 h vymývají v 7% (*V/V*) roztoku *kyseliny octové R*. Elektroforeogramy se vyhodnotí pomocí lampy se studeným světelným zdrojem. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku není žádná zóna intenzivnější než zóna se stejnou pohyblivostí, jako má hlavní zóna na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže elektroforeogram porovnávacího roztoku (c) vykazuje viditelnou zónu; na elektroforeogramech porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) je patrna gradace intenzity zbarvení.

Presorický účinek. Nejvýše 5 m.j. presorického účinku na 100 m.j. kortikotropní účinnosti. Účinek zkoušené látky na krevní tlak potkana se porovnává s účinkem mezinárodního standardu lysin-vasopresinu nebo referenčního přípravku lysin-vasopresinu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Ke zkoušce se použije bílý laboratorní potkan, samec o hmotnosti přibližně 300 g. Do ocasní žíly zvířete se vstříkne pomalu roztok vhodného alfa-adrenergního blokátoru v dávce např. 10 ml/kg tělesné hmotnosti. Roztok se připraví rozpuštěním 5 mg *fenoxybenzamoniumchloridu R* v 0,1 ml *lihu 96% R*. Přidá se 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na 5 ml. Za 18 h se potkan anestezuje vhodným anestetikem tak, aby nenastalo nepříznivé ovlivnění krevního tlaku. Za 45 min až 60 min se upevní potkan připoutáním zadních končetin v poloze na zádech k operačnímu stolku. Zavede se skleněná nebo polyethylenová kanyla o zevním průměru 2,5 mm do průdušnice a vypreparuje se arteria carotis, aby byla připravena pro zavedení kanyly. V místech tříselného vazu se vypreparuje femorální žíla. K jedné straně se odkloní povrchová stydká žíla a nastříhne se femorální žíla směrem k tříselnému vazu. Z hloubky přicházející přívodní větev femorální žíly se podváže, aby se zabránilo krvácení při zavádění kanyly. Do femorální žíly se zavede krátká polyethylenová kanyla o zevním průměru 1 mm, připevní se dvěma podvazy a připojí se pomocí krátké ohebné hadičky na byretu s obsahem 1 ml s připojenou skleněnou nálevkou s ostrým zakončením. Byreta je naplněna roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) o teplotě asi 37 °C. Preparované místo a kanyla se zakryjí navlhčenou chirurgickou rouškou, která se připevní. Vstříkne se heparin rozpuštěný v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) v dávce 200 m.j./100 g hmotnosti pokusného zvířete. Do arteria carotis se zavede kanyla o zevním průměru 1 mm a naplní se pomocí hadiček roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) s heparinem a napojí se na vhodný přístroj, který zaznamenává krevní tlak. Centrální a periferní nervový systém, včetně obou vagů a souvisejících sympatických nervů, zůstávají bez porušení. Umělé dýchání není zapotřebí. Všechny roztoky se vstříknou do žilní kanyly pomocí 1ml injekční stříkačky dělené po 0,01 ml. Po každém podání se vstříkne 0,2 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) z byrety. Dává se pozor, aby nebyl vstříknut vzduch.

Referenční přípravek a zkoušená látka se naředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby vstřikovaný objem byl v rozmezí 0,1 ml až 0,5 ml. Zvolí se dvě dávky porovnávacího roztoku tak, aby vzestup krevního tlaku odpovídal 4 kPa pro nižší dávku a 6,67 kPa pro vyšší, ale ne maximální dávku. Poměr nižší k vyšší dávce je určen vzestupem krevního tlaku a je obvykle 3 : 5. Pro počáteční přiblížení se mohou zkusit dávky 3 milijednotky a 5 milijednotek. U referenčního lysin-vasopresinu se provede výpočet geometrického průměru jednotek pro nižší a vyšší dávku. Připraví se taková dávka zkoušeného přípravku, aby v objemu 0,1 ml až 0,5 ml obsahovala dvacetinásobek tohoto průměru v mezinárodních jednotkách kortikotropinu. Dávky se vstřikují v pravidelných intervalech 10 min až 15 min, přičemž dvě dávky porovnávacího roztoku tvoří s dávkou zkoušené látky jednu skupinu o třech dávkách. Pořadí vstřikovaných dávek v následujících skupinách se náhodně střídá, až se vytvoří čtyři až pět skupin (dvanáct až patnáct dávek celkem). U každé dávky se změří maximální zvýšení krevního tlaku.

Průměrná hodnota odpovědi u zkoušené látky je menší než hodnota geometrického průměru obou dávek referenčního přípravku (5 m.j. presorické účinnosti na 100 m.j. účinnosti kortikotropinu).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 7,0 %; stanoví se ve vakuové sušárně při 60 °C a při tlaku nepřekračujícím 670 Pa.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše nejvýše 318 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Mezinárodní jednotka kortikotropinu je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Nalezená hodnota účinnosti je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je v rozmezí 64 % až 156 % deklarované účinnosti.

Stanovení účinnosti se provádí metodou A nebo B.

A. Provede se stanovení účinnosti kortikotropinu (*2.7.3*). Zvířata, u kterých byly provedena hypofyzektomie, mohou být nahrazena zvířaty, u kterých byla endogenní kortikotropní aktivita potlačena vhodnou látkou, např. dexamethasonem podávaným následujícím způsobem: každému zvířeti se vstříknou dvě dávky, každá po 0,5 ml, suspenze obsahující 2 mg dexamethasonu a arabskou klovatinu (50 g/l). První dávka se vstříkne podkožně 18 h před zahájením zkoušky, druhá dávka se vstříkne intraperitoneálně současně se zkoušenou látkou. Mezi oběma parenterálními dávkami dostávají zvířata pitnou vodu s dexamethasonem (20 μg/ml) a glukosou (50 g/l).

B. Účinnost kortikotropinu se stanoví za daných podmínek porovnáním zvýšené tvorby kortikosteronu produkovaného izolovanými buňkami nadledvin potkanů s mezinárodním standardem nebo s referenčním přípravkem kalibrovaným v mezinárodních jednotkách.

Použije se silikonované sklo před použitím dobře vymyté *vodou R*. Šetrným způsobem bez stresu se usmrtí 4 laboratorní potkani, samci o hmotnosti 200 g až 400 g. Vyjmou se nadledviny, opatrně očistí od okolní tukové tkáně a vloží do roztoku B uchovávaného při 4 °C. Každá žláza se rozkrojí na čtyři stejné díly a přenese do vhodného míchacího zařízení z plastické hmoty (viz obrázek 1), ve kterém je 5 ml roztoku C udržovaného při 37 °C. Buňky nadledvin se dispergují mícháním směsi při 500 ot/min. Po 20 min se odstraní supernatant, ochladí na 4 °C, přidá se 5 ml roztoku C a znovu míchá. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Všech pět supernatantů se spojí a odstřeďuje 30 min v polyethylenových zkumavkách při 4 °C při postupném zvyšování rychlosti do 100 g_n. Sediment se suspenduje v 8 ml roztoku D a odstřeďuje 30 min při 100 g_n Získaný sediment se znovu suspenduje v 8 ml roztoku D, směs se filtruje přes nylonovou síťku s otvory 100 μm do polyethylenové kádinky a k filtrátu se přidá vhodný objem roztoku D (bylo zjištěno, že vhodný celkový objem filtrátu je mezi 65 ml až 105 ml). Výsledný buněčný roztok se uchovává při 4 °C.

Ze zkoušeného roztoku o vhodné koncentraci a z porovnávacího roztoku se připraví s ředicím roztokem E čtyři koncentrace v geometrické řadě s dvojnásobným ředěním. 0,1 ml z každého zředění se pipetuje do čtyř polystyrenových zkumavek a do každé zkumavky se přidá 1,0 ml výše připravené buněčné suspenze. Zkumavky se inkubují 2 h při 37 °C a pak ochladí na 4 °C. 1 ml obsahu každé zkumavky se přenese do skleněných zkumavek obsahujících 1,4 ml *dichlormethanu R*, směs se promíchá 10 s na vířivé míchačce a odstřeďuje 5 min při 3000 g_n. 1 ml dichlormethanové vrstvy z každé zkumavky se přenese, bez porušení vodné vrstvy, do skleněných zkumavek obsahujících 0,6 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *kyseliny sírové R* (15 + 35). Směs se 10 s míchá na vířivé míchačce, odstřeďuje 5 min při 1500 g_n a nechá 30 min stát. Fluorimetricky (*2.2.21*) se stanoví iradiace spodní vrstvy při excitační vlnové délce 436 nm nebo 470 nm a fluorescence se měří v maximu mezi 530 nm a 545 nm. Jestliže roztoky nejsou při měření přeneseny do kyvet, je nutné vybrat zkumavky, v nichž se fluorescenční hodnoty pro standard kortikosteronu neliší mezi sebou více než o 5 %.

Výsledky stanovení se počítají obvyklými statistickými metodami. Použije se lineární část křivky závislosti odpovědi na log dávky.

Roztok A.

chlorid sodný R	6,60 g
chlorid draselný R	0,353 g
hydrogenuhličitan sodný R	0,840 g
dihydrogenfosforečnan draselný R	0,161 g
síran hořečnatý R	0,291 g
chlorid vápenatý R	0,373 g
kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]ethansulfonová	4,77 g

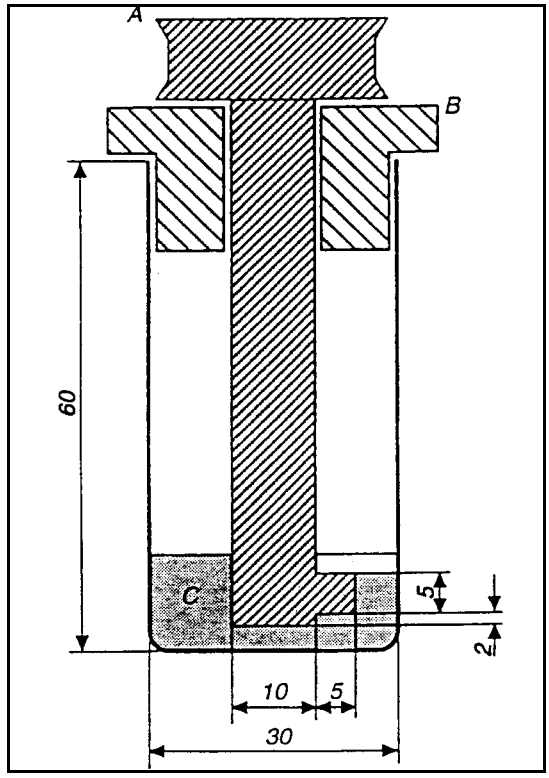
Výše uvedené látky se rozpustí přibližně v 950 ml *vody R*, pH roztoku se upraví *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* na 7,4, přidá se 60 mg *sodné soli benzylpenicilinu R* a takové množství *streptomyciniumsulfatu R*, které odpovídá 100 mg streptomycinu. Pak se roztok zředí *vodou R* na 1000 ml.

Roztok B. K roztoku A se přidá *glukosa R* (2 g/l).

Roztok C. K roztoku B se přidá kolagenasa získaná z *Clostridium histolyticum* a dostatečně čistá pro přípravu dispergovaných buněk (1 g/l).

Roztok D. K roztoku B se přidá *albumin hovězí R* (5 g/l).

Roztok E. Ke sterilnímu roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se přidá *albumin hovězí R* (1 g/l) a pH roztoku se upraví *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 2,0.



Obr. 1.

Rozměry v milimetrech
A - kladka a míchací lopatka
B - ložisko
C - inkubační roztok

Uchovávání

V dobře uzavřeném obalu chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

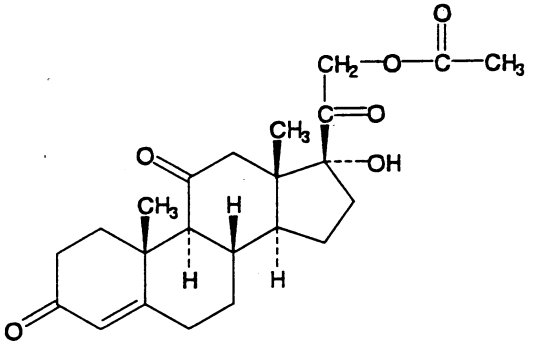
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- způsob podání při stanovení účinnosti (při použití zkoušky A),
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

† Cortisoni acetas

Kortisonacetat



$C_{23}H_{30}O_6$ M_r 402,49 CAS 50-04-4

Je to 17,21-dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion-21-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{23}H_{30}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v dioxanu, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%, v etheru a v methanolu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *kortisonacetatu CRL*. Jestliže spektrum zkoušené látky a spektrum referenční látky v tuhém stavu vykazují rozdíly, zaznamenají se spektra látek znovu za použití roztoku zkoušené látky a roztoku referenční látky (50 g/l) v *dichlormethanu R* v 0,2mm kyvetách.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *kortisonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *hydrokortisonacetatu R* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 l každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje

se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě zkoušeného roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluoroethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se intenzivně po dobu 5 min. Pak se zkumavka uzavře a zahřívá se ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem po dobu 2 h 30 min. Nechá se ochladit.

Porovnávací roztok (a). 25 mg *kortisonacetatu CRL* se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě porovnávacího roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluoroethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se intenzivně po dobu 5 min. Pak se zkumavka uzavře a zahřívá se ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem po dobu 2 h 30 min. Nechá se ochladit.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se shoduje polohou, barvou v denním světle a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; do 5 min vznikne slabě žluté zbarvení. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

E. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +211° až +220°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *kortisonacetatu CRL* a 2 mg *hydrokortisonacetatu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs připravená takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 400 ml *acetonitrilu R* s 550 ml *vody R* a nechá se ustálit, směs se doplní na 1000 ml *vodou R* a znovu se promíchá, průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se ustálí promýváním mobilní fází po dobu 30 min při průtokové rychlosti 1 ml/min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Je-li chromatogram zaznamenán za popsaných podmínek, retenční časy jsou: hydrokortisonacetatu asi 10 min a kortisonacetatu asi 12 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky hydrokortisonacetatu a kortisonacetatu není menší než 4,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatografie se nechá probíhat po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 237 nm.

Obsah $C_{23}H_{30}O_6$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 395.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. hydrokortisonacetat.

Crataegi folium cum flore

N

List hlohu s květem

Synonymum. Folium crataegi cum flore

Jsou to usušené kvetoucí vrcholky větví, až 7 cm dlouhé, druhu *Crataegus monogyna* JACQ. emend.LINDMANN nebo druhu *Crataegus laevigata* (POIR) D.C. (*Crataegus oxyacantha* L.).

Obsahuje nejméně 0,7 % flavonoidů, počítáno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$; M_r 464,4), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Úlomky tmavě hnědých, zdřevnatělých větviček o průměru 1 mm, nejvýše však 2,5 mm, nesoucích střídavé, řapíkaté listy, s malými často opadanými palisty a četnými bílými květy uspořádanými ve svazcích. Listy jsou laločnaté až peřenodílné, vroubkovaně zubaté nebo hustě pilovité. *C. laevigata* - list třílaločný až pětilaločný, tupě až vroubkovaně zubatý; *C. monogyna* -list peřenoklaný až peřenodílný se třemi až sedmi úkrojky, jemně a hustě pilovitý. Listy na svrchní straně tmavě zelené až hnědavě zelené; na spodní straně světlejší, šedozelené s dobře patrnou žilnatinou, jsou lysé nebo řídce chlupaté. Květy pětičetné, kalich přirostlý k hnědavě zelené češuli, kališní cípy trojúhelníkovité až kopinaté. Korunní lístky žlutavě bílé až nahnědlé, volné, okrouhlé až široce obvejčité, krátce nehetnaté. Tyčinky četné; semeník spodní, z jednoho až tří plodolistů, každý plodolist uzavírá jedno fertilní vajíčko. *C. monogyna* je jednosemenný, *C. laevigata* dvousemenný až třísemenný.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: jednobuněčné krycí chlupy, přímé nebo poněkud zakřivené, se ztlustlými stěnami a širokým luminem, na bázi tečkované; úlomky pokožky listů z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými až mnohohrannými, s velkými anomocytickými průduchy (*2.8.3*), obklopenými čtyřmi až sedmi buňkami; parenchymatické buňky obsahující krystaly šťavelanu vápenatého 10 μm až 20 μm velké; úlomky koruny s pokožkou z buněk okrouhle mnohohranných, ztlustlých, papilózně vychlípených, se zřetelně paprsčitě zvrásněnou kutikulou; úlomky tyčinek, endothecium na okraji pravidelně obloukovitě ztlustlé; úlomky větviček s kolenchymatickým pletivem, cévami a zdřevnatělými sklerenchymatickými vlákny s úzkým luminem; četná okrouhlá až oválně trojhranná pylová zrna o průměru až 45 μm, s hladkou exinou a třemi klíčními póry.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 1,0 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (10 mm x 3 mm) 10 μl zkoušeného roztoku a 5 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *2-butanonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 100 °C

až 105 °C a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Nad skvrnou odpovídající hyperosidu je světle modrá skvrna a další je v blízkosti čela chromatogramu. Na chromatogramu mohou být další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 8 % zdřevnatělých větévek.

Ztráta sušením (*2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 9,0 %.

Stanovení obsahu

Základní roztok. 0,600 g práškované drogy (355) se ve 100ml baňce smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Droga i chomáček vaty se vaří 10 min ještě dvakrát s 20 ml *acetonu R* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje filtračním papírem do téže odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce se zředí *acetonem R* předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethylacetatu R*. Spojené horní vrstvy se protřepávají dvakrát 50 ml *vody R* a zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do 50ml odměrné baňky. Roztok v baňce se zředí *ethylacetatem R* na 50,0 ml.
Zkoušený roztok. 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml roztoku *chloridu hlinitého RS* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% *(V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% *(V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \,.\, 1{,}25}{m},$$

v němž značí:
A - absorbanci roztoku v maximu při 425 nm,
m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu je 500.

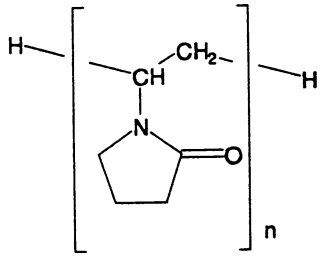
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Crospovidonum

Krospovidon

Synonymum. Crospolyvidonum



$(C_6H_9NO)_n$ M_r $(111,1)_n$ CAS 9003-39-8

Je to příčně síťovaný homopolymer 1-vinyl-2-pyrrolidonu.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý prášek nebo vločky. Je hygroskopický, prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. krospovidonu.*

B. 1 g se suspenduje v 10 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *jodu 0,05 mol/l RS* a 30 s se protřepává. Přidá se 1 ml *škrobu RS* a protřepe se; do 30 s nevznikne modré zbarvení.

C. Zkouška Látky rozpustné ve vodě, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Peroxidy. 2,0 g se suspendují v 50 ml *vody R*. K 25 ml této suspenze se přidají 2 ml *zkoumadla chlorid titanitý-kyselina sírová R*. Směs se po 30 min zfiltruje. Měří se absorbance *(2.2.25)* filtrátu při 405 nm za použití směsi 25 ml filtrátu suspenze zkoušené látky (40 g/l) a 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* 13% *(V/V)* jako kontrolní tekutiny. Absorbance není větší než 0,35 (400 μg/g, vyjádřeno jako H_2O_2).

Látky rozpustné ve vodě. 25,0 g se převede do kádinky na 400 ml, přidá se 200 ml *vody R* a 1 h se míchá magnetickým míchadlem. Suspenze se převede kvantitativně do odměrné baňky na 250,0 ml pomocí *vody R* a doplní se jí po značku. Nechá se usadit a zfiltruje se asi 100 ml téměř čiré tekutiny nad usazeninou membránovým filtrem o velikosti pórů 0,45 µm, který je chráněn předřazeným membránovým filtrem o velikosti pórů 3 µm. Během filtrace se míchá tekutina nad filtrem ručně nebo mechanickým míchadlem tak, aby se nepoškodil filtr. 50,0 ml čirého filtrátu se převede do odvážené kádinky na 100 ml, odpaří se do sucha a potom se 3 h suší při 105 °C až 110 °C. Zbytek váží nejvýše 75 mg (1,5 %).

Vinylpyrrolidon. 4,0 g se suspendují v 30 ml *vody R* a 15 min se míchá. Suspenze se odstředí a supernatantní tekutina se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (10). Ke zbytku po odstředění se přidá 50 ml *vody R* a míchá se 15 min. Opět se odstředí a supernatantní tekutina se zfiltruje přes stejný filtr ze slinutého skla (10). Postup se opakuje ještě jednou. Ke spojeným filtrátům se přidá 0,5 g *octanu sodného R* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do trvalého zbarvení. Potom se přidají další 3,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a nechá se 10 min stát. Zfiltruje se a titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 3 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace. Provede se slepá zkouška za použití 30 ml *vody R*, jejíž pH bylo upraveno na stejnou hodnotu jako zkoušený roztok *kyselinou octovou R* a ke které byl přidán stejný objem *jodu 0,05 mol/l VS* jako při první titraci zkoušeného roztoku. Spotřeba *jodu 0,05 mol/l VS* je nejvýše 0,72 ml (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Chráněn před vlhkostí.

---

† Cupri sulfas

Bezvodý síran měďnatý

Synonymum. Cupri sulfas anhydricus

$CuSO_4$ $_r$ 159,60 CAS 7758-98-7

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $CuSO_4$.

Vlastnosti

Zelenavě šedý prášek, velmi hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá několik kapek *amoniaku zředěného RS2;* vznikne modrá sraženina, která se dalším přidáním *amoniaku zředěného RS2* rozpustí za vzniku tmavě modrého zbarvení.

B. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,6 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (150 μg/g). Zkumavky se pozorují kolmo k podélným osám proti černému pozadí.

Železo. Nejvýše 150 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 0,32 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku železa (20 g Fe/ml)*, 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Měří se absorbance při 248,3 nm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-butan.

Olovo. Nejvýše 80 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,6 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku olova (100 g Pb/ml)*, 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Měří se absorbance při 217,0 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-butan.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; suší se 0,500 g v sušárně při 250 °C.

Stanovení obsahu

0,125 g se rozpustí v 50 ml *vody R*. Přidají se 2 ml *kyseliny sírové R* a 3 g *jodidu draselného R*. Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,96 mg $CuSO_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Cupri sulfas pentahydricus

Pentahydrát síranu měďnatého

$CuSO_4 . 5 H_2O$ $_r$ 249,68 CAS 7758-99-8

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $CuSO_4 . 5 H_2O$.

Vlastnosti

Modrý krystalický prášek nebo průsvitné modré krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá několik kapek *amoniaku zředěného RS2;* vznikne modrá sraženina, která se dalším přidáním *amoniaku zředěného RS2* rozpustí za vzniku tmavě modrého zbarvení.

B. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g). Zkumavky se pozorují kolmo k podélným osám proti černému pozadí.

Železo. Nejvýše 100 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku železa (20 μg Fe/ml)*, 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Měří se absorbance při 248,3 nm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-butan.

Olovo. Nejvýše 50 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 2,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)*, 2,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Měří se absorbance při 217,0 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-butan.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 35,0 % až 36,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 250 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny sírové R* a 3 g *jodidu draselného R*. Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátor.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,97 mg $CuSO_4 . 5H_2O$.

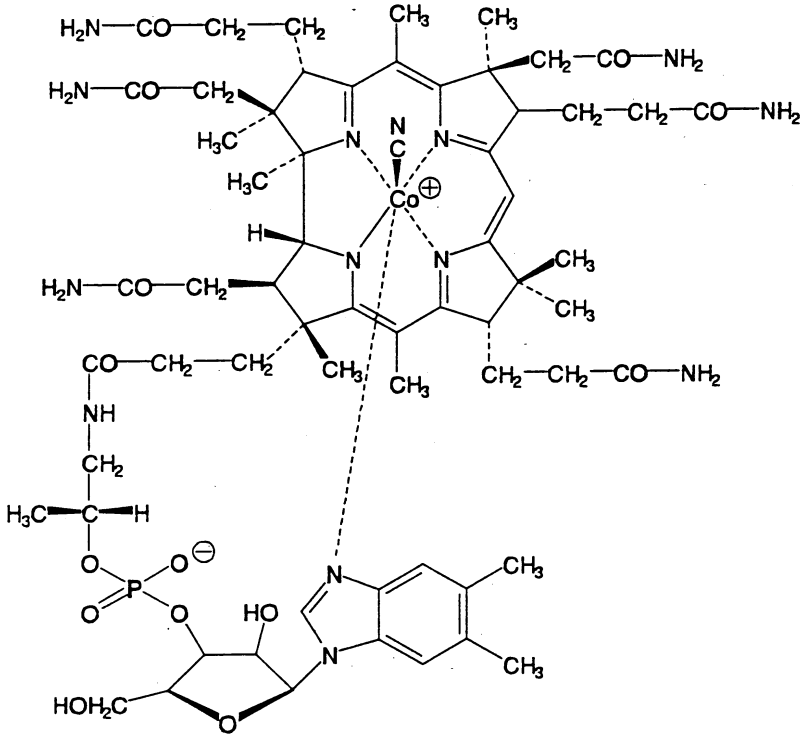
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Cyanocobalaminum

Kyanokobalamin

Synonymum. Vitamin B_{12}



$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ M_r 1355,38 CAS 68-19-9

Je to kyanid -(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamidu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$.

Vlastnosti

Tmavě červený krystalický prášek nebo tmavě červené krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru. Bezvodá látka je velmi hygroskopická.

Zkoušky totožnosti

A. 2,5 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 260 nm až 610 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 278 nm, při 361 nm a při 547 nm až 559 nm. Poměr absorbance v maximu při 361 nm k absorbanci v maximu při 547 nm až 559 nm je 3,15 až 3,45. Poměr absorbance v maximu při 361 nm k absorbanci v maximu při 278 nm je 1,70 až 1,90.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkouška se provede za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. 2 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R.*
Porovnávací roztok. 2 mg *kyanokobalaminu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R.*

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *methanolu R* a *chloroformu R* (9 + 30 + 45) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. Roztok se použije do 1 h od přípravy.
Porovnávací roztok (a). 3,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. Roztok se použije do 1 h od přípravy.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. Roztok se použije do 1 h od přípravy.
Porovnávací roztok (c). 25 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 10 ml *vody R.* Po ochlazení se přidá 5 ml roztoku *chloraminu T R* (1 g/l) a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,05 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Pak se roztok protřepe a 5 min se nechá stát. Bezprostředně před nástřikem se 1 ml tohoto roztoku zředí mobilní fází na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (10 g/l) (26,5 + 73,5), jejíž pH bylo upraveno na 3,5 *kyselinou fosforečnou R.* Směs lze použít do dvou dnů od přípravy; průtoková rychlost je 0,8 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 361 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času kyanokobalaminu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dva hlavní píky a rozlišení mezi těmito píky není menší než 2,5 a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je jeden hlavní pík s poměrem signálu k signálu šumu větším nebo rovným 5.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 12,0 %; suší se 20,00 mg ve vakuu při teplotě 100 °C až 105 °C po dobu 2 h.

Stanovení obsahu

25,00 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 361 nm.

Vypočítá se obsah sloučeniny $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 207.

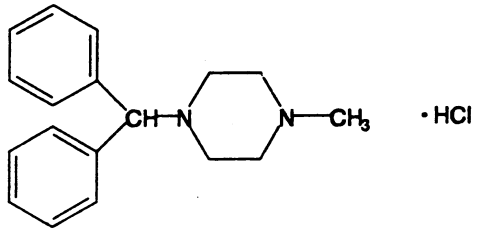
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Cyclizini hydrochloridum

Cykliziniumchlorid



$C_{18}H_{23}ClN_2$ $_r$ 302,85 CAS 303-25-3

Je to 1-benzhydryl-4-methylpiperaziniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{23}ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.

Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* (5 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml (roztok A). Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku A při 240 nm až 350 nm. Roztok A vykazuje dvě absorpční maxima; při 258 nm a 262 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 262 nm k absorbanci naměřené při 258 nm je 1,0 až 1,1.

10,0 ml roztoku A se zředí roztokem *kyseliny sírové R* (5 g/l) na 100,0 ml (roztok B). Měří se absorbance roztoku B při 210 nm až 240 nm. Roztok B vykazuje absorpční maximum při 225 nm. Specifická absorbance v maximu je 370 až 410.

Ověří se rozlišovací schopnost přístroje *(2.2.25);* zkoušku lze hodnotit, jestliže poměr absorbancí není menší než 1,7.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky s *chloridem draselným R* se shoduje se spektrem tablety *cykliziniumchloridu CRL* s *chloridem draselným R.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,5 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 10 ml *lihu R* 60% (*V/V*) a ochladí se ve vodě s ledem. Přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R.* Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje se *vodou R* a suší se 2 h při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa; zbytek taje *(2.2.14)* při 105 °C až 108 °C.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 5,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g ve směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *vody prosté oxidu uhličitého R* (40 + 60) a zředěním stejnou směsí na 25 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu. *Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cykliziniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *methylpiperazinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) ze zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *hydroxyziniumchloridu CRL* a 10 mg *cykliziniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 8 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a vystaví se na 10 min působení par jodu. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající skvrně 1-methylpiperazinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající 1-methylpiperazinu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 130 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

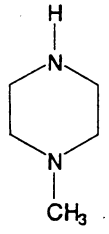
0,200 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R,* přidá se 40 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,14 mg $C_{18}H_{23}ClN_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

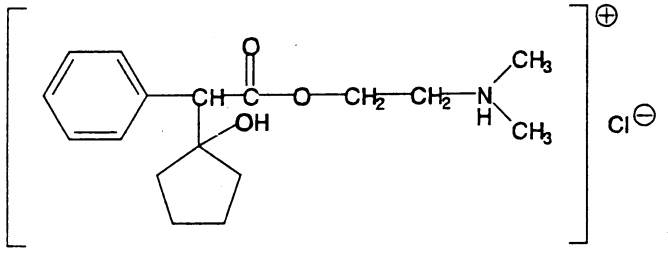
Nečistoty



A. 1-methylpiperazin.

† Cyclopentolati hydrochloridum

Cyklopentolaciumchlorid



$C_{17}H_{26}ClNO_3$ $_r$ 327,85 CAS 5870-29-1

Je to (*RS*)-2-[2-(1-hydroxycyklopentyl)-2-fenylacetoxy]ethyl-N,N-dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{17}H_{26}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 135 °C až 141 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky s *chloridem draselným R* se shoduje se spektrem tablety *cyklopentolaciumchloridu CRL* s *chloridem draselným R*. Pokud se

získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *lihu 96% R*, odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, fluorescencí a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 5,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,2 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 200 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *cyklopentolaciumchloridu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R*, *butylacetatu R* a *2-propanolu R* (5 + 15 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS* a suší se 30 min při 120 °C; pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Spotřeba se odečte mezi dvěma inflexními body.

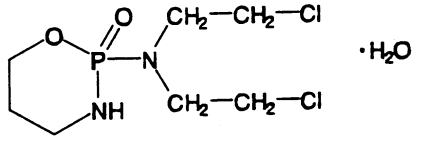
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,79 mg $C_{17}H_{26}ClNO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

†† Cyclophosphamidum

Cyklofosfamid



$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$. H_2O M_r 279,10 CAS 6055-19-2

M_r bezvodého 261,09

Je to monohydrát (*RS*)-2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2*H*-1,3,2-oxazafosforin-2-oxidu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Stanoví se teplota tání *(2.2.14)* zkoušené látky. Smíchají se stejné díly zkoušené látky a *cyklofosfamidu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Rozdíl mezi teplotami tání, které jsou asi 51 C, není větší než 2 C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *cyklofosfamidu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 5 ml *dusičnanu stříbrného RS;* roztok zůstane čirý. Po povaření vznikne bílá sraženina, která se rozpustí v *amoniaku 26% R* a znovu vznikne po přidání *kyseliny dusičné zředěné RS.*

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3).* 4,0 až 6,0; měří se roztok S ihned po přípravě.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *cyklofosfamidu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml. *Porovnávací roztok (b)*. 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *acetonu R*, *vody R* a *2-butanonu R* (2 + 4 + 12 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a 10 min se zahřívá při 110 °C. Na dno komory se umístí odpařovací miska obsahující směs stejných objemových dílů roztoku *manganistanu draselného R* (50 g/l) a *kyseliny chlorovodíkové R*. Ještě horká vrstva se vloží na 2 min do komory obsahující plynný chlor a komora se uzavře. Potom se vrstva vyjme z komory a nechá se v proudu chladného vzduchu do odstranění plynného chloru. Když část vrstvy pod startem dává pouze velmi slabé zbarvení s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS*, vystavení vrstvy chladnému vzduchu se neprodlužuje. Vrstva se postříká *škrobem s jodidem draselným RS* a po 5 min se pozoruje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Ke skvrně na startu se nepřihlíží.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,15 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml. Čerstvě připravený roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Fosforečnany *(2.4.11)*. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce na fosforečnany (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 6,0 % až 7,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 50 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (1 g/l) v *ethylenglykolu R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se chladič promyje 25 ml *vody R*, přidá se 75 ml *2-propanolu R*, 15 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 10,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 2,0 ml *síranu amonno-železitého RS2* a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,05 mg $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$.

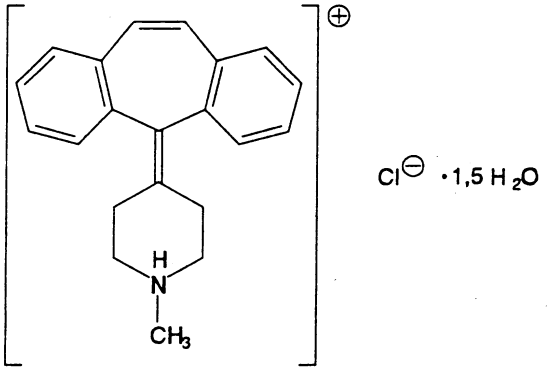
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Venenum.

† Cyproheptadini hydrochloridum

Cyproheptadiniumchlorid



$C_{21}H_{22}ClN$. $1,5H_2O$ M_r 350,89 CAS 41354-29-4

M_r bezvodého 323,86

Je to seskvihydrát 4-(5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyklohepten-5-yliden)-1-methylpiperidiniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{22}ClN$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 320 nm; roztok vykazuje maximum při 286 nm. Specifická absorbance v maximu je 335 až 365, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *cyproheptadiniumchloridu CRL*. Měří se látky připravené ve formě emulzí v *parafinu tekutém R*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cyproheptadiniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *imipraminiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 2 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *etheru R* a *cyklohexanu R* (5 + 20 + 75) po dráze 15 cm. Po usušení na vzduchu se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu

zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Nasycený roztok zkoušené látky vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 25 ml a přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *dibenzocycloheptenu CRL* (5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten) se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 50 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS,* zahřívá se 30 min při 110 °C. Pozoruje se ještě za horka v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající dibenzocykloheptenu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající dibenzocykloheptenu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 7,0 % až 9,0 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 700 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

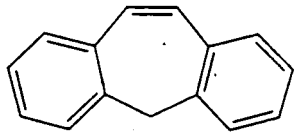
0,250 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml lihu 96% *R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,39 mg $C_{21}H_{22}ClN$.

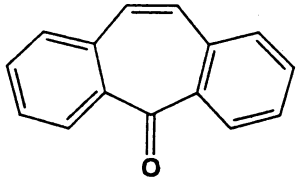
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



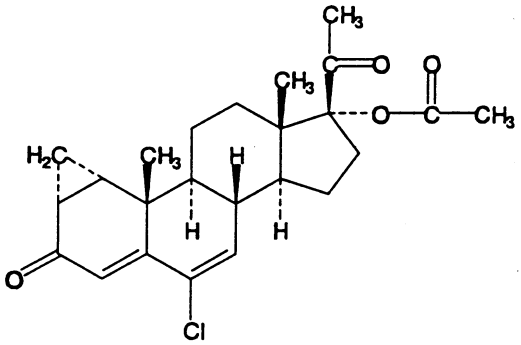
A. 5*H*-dibenzo[*a,d*]cyklohepten,



B. dibenzosuberon (dibenzo[*a,d*]cykloheptanon).

† Cyproteroni acetas

Cyproteronacetat



$C_{24}H_{29}ClO_4$ M_r 416,94 CAS 427-51-0

Je to 6-chlor-1 ,2 -methylen-3,20-dioxo-4,6-pregnadien-17-ylacetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{24}H_{29}ClO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, snadno rozpustný v acetonu, dobře rozpustný v methanolu a mírně rozpustný v ethanolu.

Taje při teplotě asi 210 C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *cyproteronacetatu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *cyproteronacetatu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *cyklohexanu R* a *ethylacetatu R* (50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a vyvíjení se zopakuje. Vrstva se znovu usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K asi 1 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a roztok se zahřívá 2 min na vodní lázni; vzniká červené zbarvení. Po ochlazení se roztok opatrně přidá ke 4 ml *vody R* a protřepe se; zbarvení se změní na fialové.

D. Asi 30 mg se smíchá s 0,3 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a spaluje se nad otevřeným plamenem po dobu asi 10 min. Zbytek se ochladí, rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné R* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

E. Vyhovuje zkoušce na acetyl (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +152° až +157°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,25 g v *acetonu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v *acetonitrilu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonitrilem R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *medroxyprogesteronacetatu CRL* se rozpustí v *acetonitrilu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsi-lanizovaným pro chromatografii R* (3 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60), s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píky odpovídajícími cyproteronacetatu a medroxyprogesteronacetatu není menší než 3,0.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času cyproteronacetatu (který je asi 20 min). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 80 °C a při tlaku nepřekračujícím 0,7 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

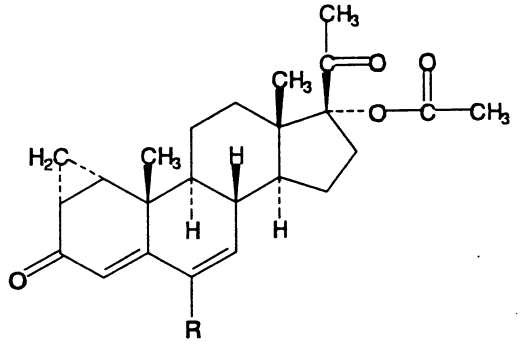
Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 282 nm. Obsah $C_{24}H_{29}ClO_4$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 414.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



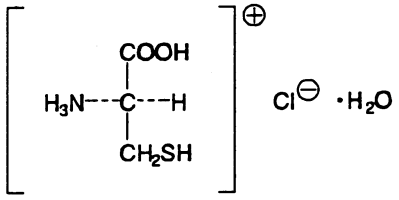
A. R = H: 1 ,2 -methylen-3,20-dioxo-4,6-pregnadien-17-ylacetat,

B. R = OCH_3: 6-methoxy-1 ,2 -methylen-3,20-dioxo-4,6-pregnadien-17-ylacetat.

† Cysteini hydrochloridum

Cysteiniumchlorid

Synonyma. Cysteini hydrochloridum monohydricum, L-Cysteinium chloratum



$C_3H_8ClNO_2S$. H_2O M_r 175,63 CAS 7048-04-6
M_r bezvodého 157,61

Je to monohydrát (*R*)-2-merkapto-1-karboxyethylamoniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_3H_8ClNO_2S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cysteiniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 5 mg se rozpustí v 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a přidá se 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (30 g/l); vznikne intenzivní fialové zbarvení, které se změní na hnědočervené a potom na oranžové. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R;* zbarvení roztoku se změní na zelené.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +5,5° až +7,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 2,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml roztoku *N-ethylmaleinimidu R* (20 g/l) v *lihu 96% R* a nechá se 5 min stát.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *cysteiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R,* zředí se jí na 10 ml, přidá se 10 ml roztoku *N-ethylmaleinimidu R* (20 g/l) v *lihu 96% R* a nechá se 5 min stát.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *tyrosinu CRL* se rozpustí v 10 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *vodou R* na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (b), (c) a (d) a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká *ninhydrinem RS* a potom se zahřívá 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jsou-li na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji na sebe. Na vnitřní stranu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm zvlhčeného několika kapkami *vody R*. Na dolní sklíčko se umístí 50 mg upráškované zkoušené látky rozpuštěné v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R*, směs se rychle promíchá skleněnou tyčinkou, okamžitě se obě sklíčka spojí a zahřívají se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není zbarven intenzivněji modře než papír lakmusový u porovnávacího vzorku připraveného současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. V dělicí nálevce se rozpustí 0,50 g v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a 3 min se třepe. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R*, upraví se pH na hodnotu 3 až 4 *amoniakem 26% R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 8,0 % až 12,0 %; 1,000 g se suší 24 h za tlaku nepřevyšujícího 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

V baňce se zabroušenou zátkou se rozpustí 0,300 g a 4 g *jodidu draselného R* ve 20 ml *vody R*. Roztok se ochladí ve vodě s ledem, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 25,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS*. Baňka se uzavře a nechá se 20 min stát v temnu. Potom se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 3 ml *škrobu RS* jako indikátoru, který se přidá před koncem titrace. Provede se slepá zkouška.

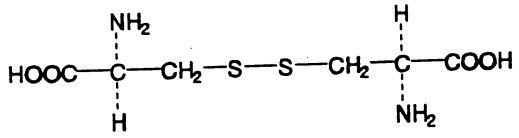
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 15,76 mg $C_3H_8ClNO_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Cystinum

Cystin



$C_6H_{12}N_2O_4S_2$ M_r 240,29 CAS 56-89-3

Je to kyselina (*R,R*)-3,3 -dithiobis(2-aminopropionová). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{12}N_2O_4S_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cystinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 g se opatrně přidá 1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a 0,1 ml *chloridu železitého RS1* a nechá se ochladit. Potom se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 5 ml *vody R*. Přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1*. Do 3 min vzniká zákal nebo bílá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -218° až -224°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cystinu CRL* se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *cystinu CRL* a 10 mg *argininiumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká *ninhydrinem RS* a potom se zahřívá 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g), bez dalšího přidání *kyseliny dusičné zředěné RS*.

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 0,10 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (200 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 0,2 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. V dělicí nálevce se rozpustí 1,0 g v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a 3 min se třepe. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v baňce se zabroušenou zátkou ve směsi 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R*. Přidá se 10 ml roztoku *bromidu draselného R* (200 g/l), 50,0 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* a 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Baňka se uzavře, ochladí ve vodě s ledem a nechá se 10 min stát v temnu. Potom se přidá 1,5 g *jodidu*

draselného R a po 1 min se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *škrobu RS* jako indikátoru, který se přidá před koncem titrace. Provede se slepá zkouška.

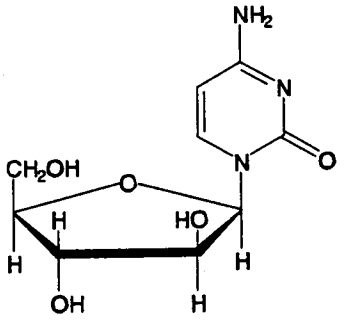
1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* odpovídá 2,403 mg $C_6H_{12}N_2O_4S_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Cytarabinum

Cytarabin



$C_9H_{13}N_3O_5$ M_r 243,22 CAS 147-94-4

Je to 4-amino-l-(ß-D-arabinofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_9H_{13}N_3O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Taje při asi 215 °C.

Zkoušky totožnosti

A. 20,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 281 nm. Specifická absorbance v maximu je 540 až 570.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *cytarabinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +154° až +160°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *cytarabinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *uridinu R* a 20 mg *uracil-arabinosidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *acetonu R* a *2-butanonu R* (15 + 20 + 65) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jsou-li na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,250 g se suší 3 h nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a tlaku 0,2 kPa až 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,32 mg $C_9H_{13}N_3O_5$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. uracil-arabinosid (1-β-D-arabinofuranosyluracil),

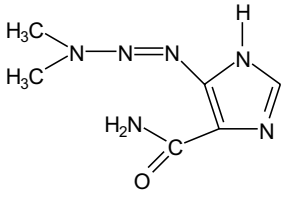
B. uridin (1-β-D-ribofuranosyluracil).

1448

† Dacarbazinum

N

Dakarbazin



$C_6H_{10}N_6O$ M_r182,18 CAS 4342-03-4

Je to 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazol-4-karboxamid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{10}N_6O$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96 %, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů.

Taje při asi 205 °C až 215 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dakarbazinu CRL.* Měří se tablety látek s *bromidem draselným R.*

B. 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 210 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 225 nm a 323 nm.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,200 g zkoušené látky, 0,200 g *kyseliny citronové R* a 0,100 g *mannitolu R* se rozpustí za ochrany před světlem ve 20 ml *vody R.* Tento roztok se použije také pro zkoušku Absorbance. Roztok hodnocený ihned po přípravě je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Absorbance (*2.2.25*). Měří se absorbance roztoku připraveného ve zkoušce Vzhled roztoku při 500 nm ihned po přípravě a po 3h stání za ochrany před světlem; absorbance zjištěná ihned po přípravě roztoku je nejvýše 0,020 a po 3 h stání je nejvýše 0,050.

Příbuzné látky. Nejvýše 0,5 % 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu (dakarbazin nečistota A (AICA)) a nejvýše 1,0 % 2-azahypoxanthinu (dakarbazin nečistota C (AHX)). Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Tlumivý roztok citronanový o pH 4,0. 42,0 g *kyseliny citronové R* a 9,5 g *hydroxidu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. V případě potřeby se upraví pH *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* na hodnotu 4,0.

Rozpouštěcí směs. 5,0 g *kyseliny citronové R* a 2,5 g *mannitolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500 ml.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 50,0 ml. Nastřikuje se ihned po přípravě.

Porovnávací roztok (a). 0,100 g *dakarbazinu CRL* se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu CRL* se zředí rozpouštěcí směsí na 50,0 ml (základní roztok, použije se k přípravě porovnávacího roztoku (d)). 5,0 ml tohoto roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *2-azahypoxanthinu CRL* se zředí rozpouštěcí směsí na 50,0 ml (základní roztok, použije se k přípravě porovnávacího roztoku (d)). 5,0 ml tohoto roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 50 mg *dakarbazinu CRL* se rozpustí v rozpouštěcí směsi, přidá se 5 ml základního roztoku připraveného u porovnávacího roztoku (b) a 5 ml základního roztoku připraveného u porovnávacího roztoku (c) a zředí se rozpouštěcí směsí na 50 ml. Roztok se před použitím nechá 2 h stát na denním světle.

Chromatografický postup se obvykle provede za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R*,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku citronanového o pH 4,0* (60 + 940), s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (d). Za dodržení předepsaných podmínek jsou relativní retenční časy látek vztažené k dakarbazinu: 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu asi 0,17, 2-azahypoxanthinu asi 0,22 a 5-diazoimidazol-4-karboxamidu asi 0,28 (dakarbazin nečistota B (DIAZO)), viz vzorový chromatogram. Nastříkne se 20 μl rozpouštěcí směsi.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) rozlišení mezi píkem 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu a píkem 2-azahypoxanthinu je nejméně 1,5 a rozlišení mezi píkem 2-azahypoxanthinu a píkem 5-diazoimidazol-4-karboxamidu je nejméně 1,5 a pík 5-aminoimidazol-4-karboxamidu je zřetelně oddělen od píků rozpouštěcí směsi. Pokud nebylo dosaženo předepsaných podmínek, sníží se obsah methanolu v mobilní fázi.

Nastřikuje se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku, 20 μl porovnávacího roztoku (a), 20 μl porovnávacího roztoku (b), 20 μl porovnávacího roztoku (c) a 20 μl porovnávacího roztoku (d). Z ploch odpovídajících píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a (c) a koncentrací příslušných roztoků se vypočítá obsah 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu (x_1) a obsah 2-azahypoxanthinu (x_2) v procentech jako průměr ze dvou nástřiků podle vzorce:

$$X_{1(2)} = \frac{S_{1(2)} \cdot m_{1(2)} \cdot b_{1(2)} \cdot (1 - a_{1(2)}) \cdot 10}{S_{1RL(2RL)} \cdot m},$$

v němž značí:

m - navážku zkoušené látky v miligramech,

$m_{1(2)}$ - navážku *5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu CRL* v porovnávacím roztoku (b) (*2-azahypoxanthinu CRL* v porovnávacím roztoku (c)) v miligramech,

$a_{1(2)}$ - hmotnostní zlomek vody v *5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu CRL* (*2-azahypoxanthinu CRL*),

$b_{1(2)}$ - hmotnostní zlomek 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu (2-azahypoxanthinu) v bezvodém *5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu CRL* (*2-azahypoxanthinu CRL*),

$S_{1(2)}$ - průměrnou plochu píku 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu (2-azahypoxanthinu) na chromatogramu zkoušeného roztoku,

$S_{1RL(2RL)}$ - průměrnou plochu píku 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2-azahypoxanthinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c)).

Potom se hodnotí na chromatogramu zkoušeného roztoku obsah 5-diazoimidazol-4-karboxamidu a jiných nečistot metodou vnitřní normalizace. Plocha píku odpovídajícího 5-diazoimidazol-4-karboxamidu je nejvýše 0,3 % celkové plochy všech píků a žádný pík, kromě píku dakarbazinu, píku 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochloridu, 2-azahypoxanthinu a 5-diazoimidazol-4-karboxamidu, nepřevyšuje jednotlivě 0,1 % součtu ploch všech píků.

Součet všech nečistot je nejvýše 2,0 %

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

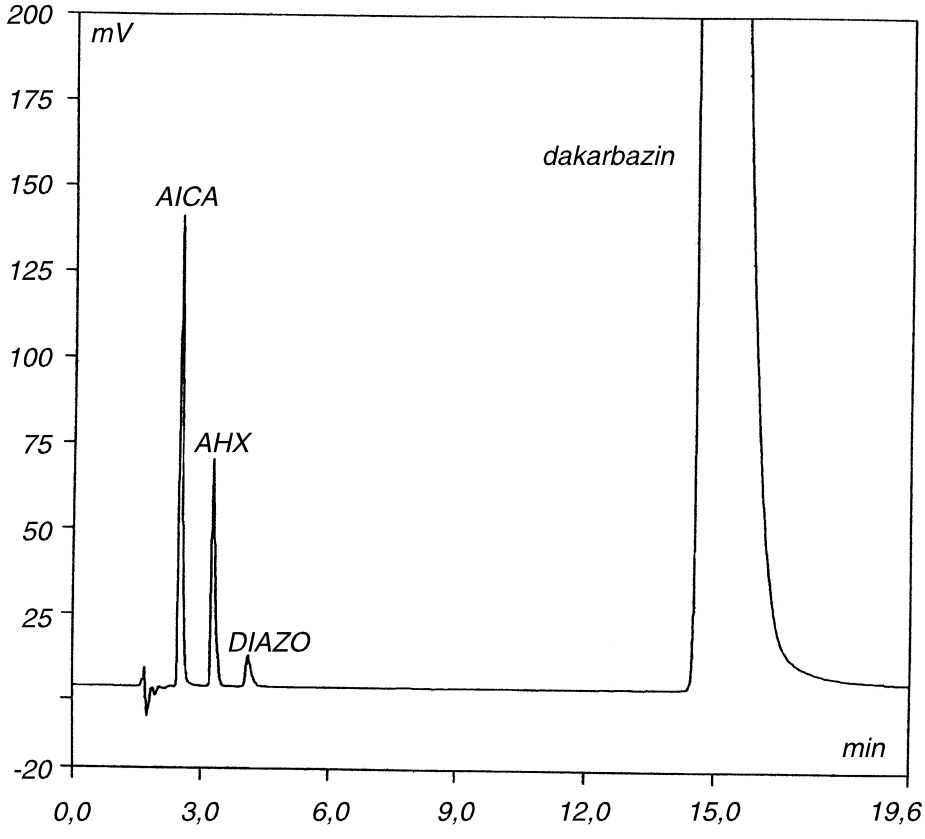
0,100 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,22 mg $C_6H_{10}N_6O$.

Uchovávání

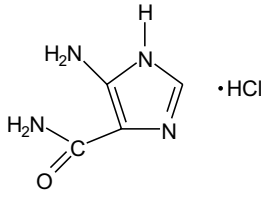
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

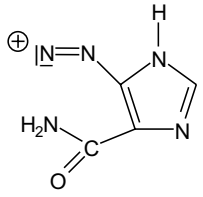


Obr. 1. Vzorový chromatogram

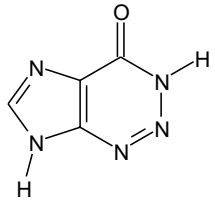
Nečistoty



A. 5-aminoimidazol-4-karboxamidhydrochlorid (AICA),



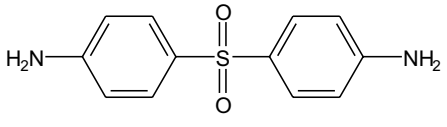
B. 5-diazoimidazol-4-karboxamid (DIAZO),



C. 2-azahypoxanthin (AHX).

† Dapsonum

Dapson



$C_{12}H_{12}N_2O_2S$ M_r 248,30 CAS 80-08-0

Je to 4,4′-sulfonyldianilin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{12}N_2O_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutobílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se snadno ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 175 °C až 181 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 260 nm a při 295 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je 700 až 760 a v maximu při 295 nm je 1150 až 1250.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *dapsonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 1 μl zkoušeného roztoku (b), 1 μl porovnávacího roztoku (a), 10 μl zkoušeného roztoku (a), 10 μl porovnávacího roztoku (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (c). Vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methanolu R, ethylacetatu R* a *heptanu R* (1 + 6 + 20 + 20) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *dimethylaminocinnamaldehydu R* (1 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *lihu 96% R* (1 + 99) a pozoruje se v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2%).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech *(2.5.8)*.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,42 mg $C_{12}H_{12}N_2O_2S$.

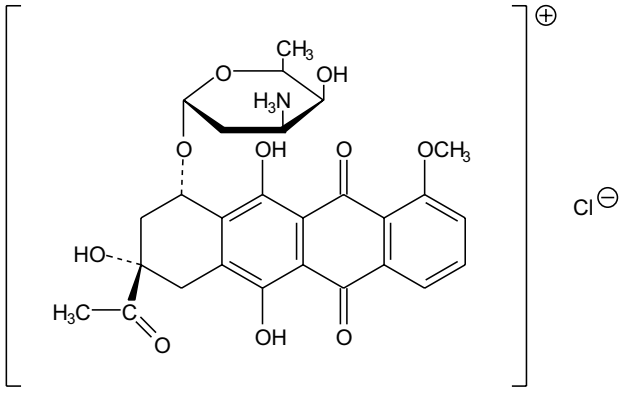
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Daunorubicini hydrochloridum

Daunorubiciniumchlorid

Synonymum. Daunorubicinium chloratum



$C_{27}H_{30}ClNO_{10}$ M_r 563,99 CAS 23541-50-6

Je to (8*S*,10*S*)-8-acetyl-10-[(3-amonio-2,3,6-trideoxy-α-L-*lyxo*-hexopyranosyl)oxy]-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydronaftacen-5,12-dion-chlorid. Tato látka je produkována určitými kmeny *Streptomyces coeruleorubidus* nebo *Streptomyces peucetius* nebo se získává jinými způsoby. Počítáno na bezvodou látku prostou rozpouštědel, obsahuje 95,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{27}H_{30}ClNO_{10}$.

Výroba

Připravuje se výrobními postupy určenými k vyloučení nebo omezení přítomnosti histaminu.

Vlastnosti

Oranžově červený krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml. Měří se absorbance při 220 nm až 550 nm (*2.2.25*). Roztok vykazuje šest absorpčních maxim; při 234 nm, 252 nm, 288 nm, 475 nm, 495 nm a 530 nm.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *daunorubiciniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí

hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a liší se polohou od hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 0,5 ml *kyseliny dusičné R*, přidá se 0,5 ml *vody R* a zahřívá se 2 min nad plamenem. Nechá se zchladnout a přidá se 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1;* vzniká bílá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 50 mg ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok (a). 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *daunorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *doxorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *aglykon daunorubicinu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 15 mg *hydroxydaunorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). K 10 ml porovnávacího roztoku (d) se přidá 20 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl z každého roztoku do 5mm proužků. Vyvíjí se v nenasycené chromatografické komoře směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 2 + 15 + 82) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a ihned se hodnotí. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna odpovídající aglykonu daunorubicinu intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Skvrna odpovídající hydroxydaunorubiciniumchloridu není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,5 %). Žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících aglykonu daunorubicinu a hydroxydaunorubiciniumchloridu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,75 %).

Aceton a butanol. Nejvýše 0,5 % acetonu a 1,0 % butanolu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *dioxanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* obsahující *dioxan R* (1 g/l) a zředí se stejným rozpouštědlem na 1,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,50 g *1-butanolu R*, 0,25 mg *acetonu R* a 1,0 g *dioxanu R* se smíchá a zředí se *vodou R* na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R1* impregnovanou 10 % *polyethylenglykolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru,
- teplota kolony se udržuje na 70 °C.

Nastřikuje se 1 µl z obou roztoků.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; provede se s 0,100 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na kilogram hmotnosti králíka vstřikuje 1 ml roztoku zkoušené látky (2,5 mg/ml) ve *vodě na injek-ci R*. Vstříknutí se provádí rychlostí 1 ml/15 s. Použijí se králíci, kteří nebyli již dříve použiti u anthracyklinových derivátů ke zkoušce na pyrogenní látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *daunorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *daunorubiciniumchloridu CRL* a 10,0 mg *hydroxydaunorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min, která je směsí objemových dílů *methanolu R*, *acetonitrilu R*, roztoku obsahujícího *laurylsíran sodný R* (2,88 g/l) a *kyselinu fosforečnou R* (2,30 g/l) (5 + 45 + 50),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se šestkrát 20 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky daunorubicinu a hydroxydaunorubicinu je nejméně 2,0 a žádný pík odpovídající daunorubicinu se neliší plochou více než o 2,0 % od průměrné plochy. Pokud tato kritéria nejsou splněna, upraví se pracovní podmínky. Nastřikuje se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a) a vypočítá se obsah $C_{27}H_{30}ClNO_{10}$ v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

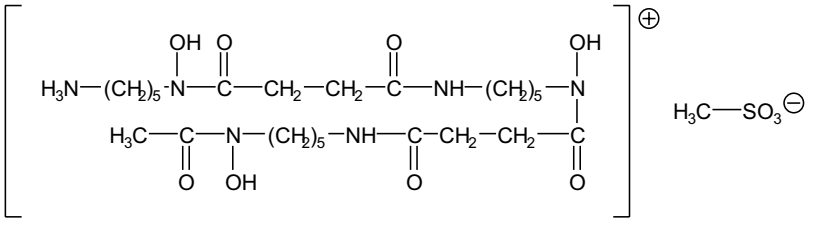
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

† Deferoxamini mesilas

Deferoxaminiummesilat



$C_{26}H_{52}N_6O_{11}S$ M_r 656,79 CAS 138-14-7

Je to (3,14,25-trihydroxy-2,10,13,21,24-pentaoxy-3,9,14,20,25-penta-azatriakontan-30-yl)amoniummethansulfonat. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{26}H_{52}N_6O_{11}S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *deferoxaminiummesilatu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *lihu 96% R*, odpaří se do sucha a změří se nová spektra.

B. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidají se 2 ml roztoku *fosforečnanu sodného dodekahydrátu R* (5 g/l) a 0,5 ml roztoku *naftochinonsulfonanu sodného R* (25 g/l); vzniká hnědočerné zbarvení.

C. Ztitrovaný roztok ze Stanovení obsahu (roztok (a)) je hnědočervený. K 10 ml roztoku (a) se přidají 3 ml *etheru R* a protřepe se; organická vrstva je bezbarvá. K 10 ml roztoku (a) se přidají 3 ml *benzylalkoholu R* a protřepe se; organická vrstva je hnědočervená.

D. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS2;* roztok je čirý. V porcelánovém kelímku se smíchá 0,1 g s 1 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, zahřeje se, vyžíhá se nad otevřeným plamenem a nechá se vychladnout. Zbytek po žíhání se rozpustí v 10 ml *vody R*, je-li třeba zahřátím, a zfiltruje. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,7 až 5,5; měří se čerstvě připravený roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví těsně před použitím, chráněny před světlem.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *deferoxaminiummesilatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 µm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 2 ml/min, kterou je roztok připravený následovně: 1,32 g *fosforečnanu amonného R* a 0,37 g *edetanu disodného R* se rozpustí v 950 ml *vody R*, pH se upraví *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu pH 2,8 (asi 3 ml až 4 ml) a přidá se 55 ml *tetrahydrofuranu R*,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku s relativním retenčním časem asi 0,8 nebyla menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem s relativním retenčním časem asi 0,8 a hlavním píkem není menší než 1,0.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času deferoxaminu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (4,0 %); součet ploch všech těchto píků není větší než 1,75násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (7,0 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,02násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Chloridy *(2.4.4)*. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 µg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 20 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (400 µg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,025 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidají se 4 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a titruje se *síranem amonno-železitým 0,1 mol/l VS;* před koncem titrace se titruje stejnoměrně rychlostí asi 0,2 ml/min. Bod ekvivalence se stanoví potenciometricky *(2.2.20)* za použití platinové indikační a kalomelové srovnávací elektrody. Ztitrovaný roztok se použije ke zkoušce totožnosti C.

1 ml *síranu amonno-železitého 0,1 mol/l VS* odpovídá 65,68 mg $C_{26}H_{52}N_6O_{11}S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2° C až 8 °C. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

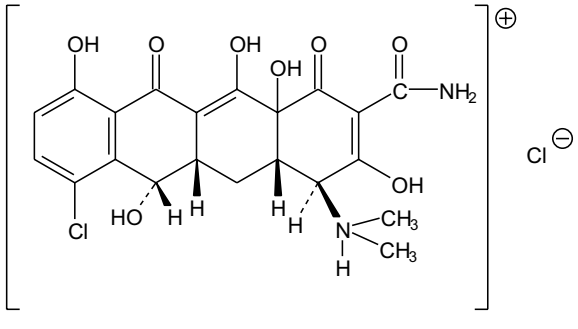
Nečistoty

A. deferoxamin A_1 (desferrioxamin A_1),

B. jiné deferoxaminy (desferrioxaminy).

† Demeclocyclini hydrochloridum

Demeklocykliniumchlorid



$C_{21}H_{22}Cl_2N_2O_8$ M_r 501,32 CAS 64-73-3

Je to (4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-(7-chlor-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy--2-karbomoyl-1,11-dioxo-4-naftacenyl)dimethylamoniumchlorid, který je produkován růstem určitých kmenů *Streptomyces aureofaciens* nebo získán jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 89,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{21}H_{22}Cl_2N_2O_8$.

Vlastnosti

Žlutý prášek. Je dobře rozpustný nebo mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na 7,0, (asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm). Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *demeklocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *demeklocykliniumchloridu CRL*, 5 mg *oxytetracykliniumchloridu CRL* a 5 mg *metacykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vznikne fialové zbarvení. Roztok se přidá k 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní ve žluté.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,0 až 3,0. Měří se následující roztok: 0,1 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -248° až -263°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 10,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 12 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Specifická absorbance při 385 nm je 340 až 370, počítáno na bezvodou látku.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu. Nastřikuje se zkoušený roztok a porovnávací roztok (d). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (5 %). Nejvýše jeden takový pík má plochu větší než 0,8násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (4 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (10 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %, provede se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %, stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *demeklocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 5,0 mg *4-epidemeklocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 5,0 ml porovnávacího roztoku (b) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je roztokem připraveným takto: naváží se 80,0 g *terc.butanolu R* a přenese se do odměrné baňky na 1000 ml pomocí 200 ml *vody R;* přidá se 100 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu draselného R* (35 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na 9,0, 150 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 9,0, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (40 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 9,0; zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl,
- elektronického integrátoru.

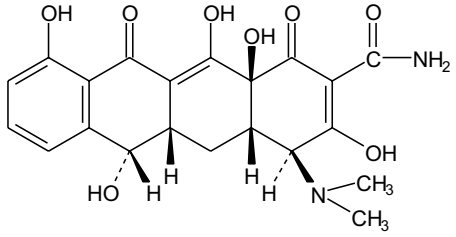
Teplota kolony se udržuje na 60 °C. Nastříkne se porovnávací roztok (c) a citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška píků byla nejméně polovina celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (4-epidemeklocyklin) a druhým píkem (demeklocyklin) je nejméně 3,0. Je-li třeba, upraví se obsah terc.butanolu v mobilní fázi. Faktor symetrie druhého píku je nejvýše 1,25. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku demeklocyklinu nejvýše 1,0 %. Je-li třeba, upraví se parametry integrátoru. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě. Obsah demeklocykliniumchloridu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

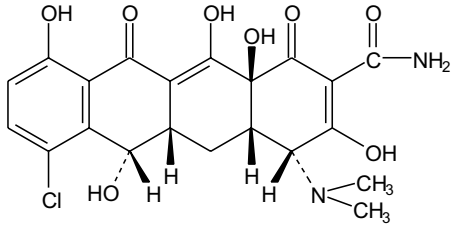
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



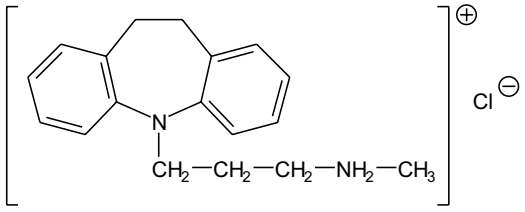
A. demethyltetracyklin,



B. 4-epidemeklocyklin.

† Desipramini hydrochloridum

Desipraminiumchlorid



$C_{18}H_{23}ClN_2$ M_r 302,85 CAS 58-28-6

Je to 3-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepin-5-yl)-N-methylpropylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{23}ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 214 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 251 nm a prodlevu při 270 nm. Specifická absorbance v maximu je 255 až 285.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *desipraminiumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 50 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R* a přidá se 0,05 ml roztoku *chinhydronu R* (25 g/l) v *methanolu R*. Do 15 min vznikne intenzivní růžové zbarvení.

E. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1,5 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí, v případě potřeby zahřátím nejvýše na 30 °C, ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Čerstvě připravený roztok S není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za chránění před přímým světlem*. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* a zředí se jí na 10 ml. Připravuje se v čas potřeby.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *desipraminiumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* a zředí se jí na 25 ml. Připravuje se v čas potřeby.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* na 50 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *toluenu R* (1 + 10 + 10) po dráze 7 cm. Vrstva se suší 10 min v proudu vzduchu, postříká se roztokem *dichromanu draselného R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (4 + 1) a ihned se pozoruje. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

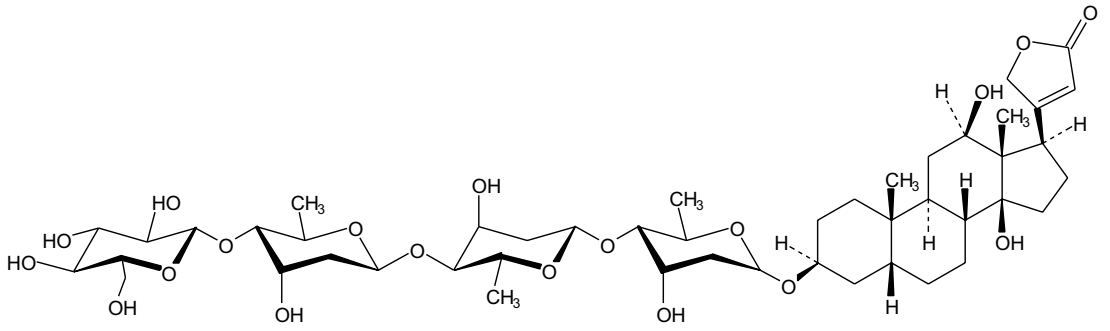
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,28 mg $C_{18}H_{23}ClN_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

†† Deslanosidum

Deslanosid



$C_{47}H_{74}O_{19}$ M_r 943,09 CAS 17598-65-1

Je to 3β-[(O-β-D-glukopyranosyl-(1→4)-O-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl-(1→4)-O-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl)oxy]-12β,14-dihydroxy-5β,14β--kard-20(22)-enolid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 105,0 % sloučeniny $C_{47}H_{74}O_{19}$.

Vlastnosti

Bílý krystalický nebo jemně krystalický hygroskopický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru, velmi těžce rozpustný v lihu 96%. Při nízké vzdušné relativní vlhkosti ztrácí vodu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *deslanosidu CRL*. Při porovnávání spektra je třeba věnovat zvláštní pozornost nepřítomnosti zřetelného absorpčního maxima při asi 1260 cm^{-1} a intenzitě absorpčního maxima při asi 1740 cm^{-1}.

Tableta zkoušené látky a tableta referenční látky s *bromidem draselným R* se připraví následovně: 1 mg zkoušené látky a 1 mg referenční látky se odděleně rozpustí v 0,3 ml *methanolu R* a homogenizuje se s asi 0,4 g jemně upráškovaného a vysušeného *bromidu draselného R* tak dlouho, až je směs dokonale suchá.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 0,5 mg se suspenduje v 0,2 ml lihu 60% *(V/V)*. Přidá se 0,1 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vzniká fialové zbarvení.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 0,05 ml *chloridu železitého RS1,* na tento roztok se opatrně navrství 2 ml *kyseliny sírové R* tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev, a nechá se stát. Na styku obou tekutin vznikne hnědý prstenec, ne však načervenalý; stáním se horní vrstva zbarví zelenožlutě a potom modrozeleně.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +6,5° až +8,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,200 g v *pyridinu bezvodém R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). Použije se roztok S.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *deslanosidu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese do 10mm proužků po 5 μl každého roztoku a ihned se vyvíjí směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (3 + 36 + 130) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, postříká se směsí objemových dílů *kyseliny sírové R* a *lihu 96% R* (5 + 95), 15 min se suší při 140 °C a pozoruje se v denním světle.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší ve vakuové sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným ve zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Současně za stejných podmínek se připraví porovnávací roztok za použití 50,0 mg nevysušeného *deslanosidu CRL.* K 5,0 ml každého roztoku se přidají 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS* a nechá se 40 min ve vodní lázni při (20 ± 1) °C za chránění před světlem. Měří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 484 nm proti současně připravenému kontrolnímu roztoku, kterým je směs 5,0 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS.*

Obsah $C_{47}H_{74}O_{19}$ se vypočítá ze zjištěných absorbancí a koncentrací roztoků.

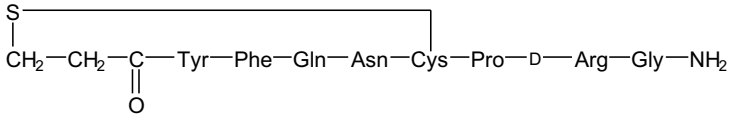
Uchovávání

Ve vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřesahující 10 °C.
Venenum.

† Desmopressinum

1998

Desmopressin



$C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$ M_r 1069,22 CAS 16679-58-6

Je to syntetický cyklický nonapeptid s antidiuretickým účinkem. Počítáno na bezvodou a kyseliny octové prostou látku, obsahuje 95,0 % až 105 % sloučeniny $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$. Používá se ve formě acetatu.

Vlastnosti

Bílý sypký prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v kyselině octové ledové.

Zkouška totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané při Stanovení obsahu. Retenční čas a velikost hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku se shodují s retenčním časem a velikostí hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7).* -72° až -82°, počítáno na bezvodou a kyseliny octové prostou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 10,0 mg v roztoku *kyseliny octové ledové R* 1% *(V/V)* a zředěním stejným rozpouštědlem na 5,0 ml.

Aminokyseliny. Stanoví se pomocí analyzátoru aminokyselin. Přístroj se kalibruje směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a L-formy následujících aminokyselin:

lysin	threonin	alanin	leucin
histidin	serin	valin	tyrosin
arginin	kyselina glutamová	methionin	fenylalanin
kyselina asparagová	prolin	isoleucin	

a polovinu ekvimolárního množství L-cystinu. K validaci postupu se použije vhodný vnitřní standard, např. *DL-norleucin R*.

Zkoušený roztok. 1,0 mg zkoušené látky se smíchá v pečlivě vymyté silnostěnné zkumavce délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Přidá se vhodné množství 50% (*V/V) kyseliny chlorovodíkové R*. Zkumavka se ponoří do chladicí směsi při -5 °C a sníží se tlak pod 133 Pa, těsně se uzavře a zahřívá 16 h při 110 °C až 115 °C. Po ochlazení se otevře a obsah se přenese do 10ml baňky pomocí pětkrát 0,2 ml *vody R*. Potom se obsah baňky odpaří do sucha za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R*, zbytek se rozpustí ve *vodě R*, odpaří do sucha za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R;* postup se opakuje ještě jednou. Odparek se převede do tlumivého roztoku vhodného pro analyzátor kyselin a zředí se jím na vhodný objem.

Přesně změřený vhodný objem zkoušeného roztoku se nastříkne do analyzátoru aminokyselin. Objem by měl být takový, aby výška píku nejvíce zastoupené aminokyseliny zaujímala větší část stupnice zapisovače.

Obsah každé aminokyseliny se vyjádří v molech. Relativní podíl jednotlivých aminokyselin se vypočte za předpokladu, že šestina součtu molárního množství kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, prolinu, glycinu, argininu a fenylalaninu se rovná jedné. Relativní obsah jednotlivých aminokyselin je v rozmezí: kyselina asparagová 0,95 až 1,05; kyselina glutamová 0,95 až 1,05; prolin 0,95 až 1,05; glycin 0,95 až 1,05; arginin 0,95 až 1,05; fenylalanin 0,95 až 1,05; tyrosin 0,70 až 1,05; polovina cystinu 0,30 až 1,05. Lysin, isoleucin a leucin nejsou přítomny; ostatní aminokyseliny mohou být přítomny pouze ve stopovém množství.

Příbuzné peptidy. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)* za použití postupu uvedeného ve Stanovení obsahu, v podmínkách eluce podle dále uvedené tabulky, při průtokové rychlosti 1,5 ml/min.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 4	76	24	izokraticky
4 - 18	76 → 58	24 → 42	lineární gradient
18 - 35	58 → 48	42 → 52	lineární gradient
35 - 40	48 → 76	52 → 24	návrat k původním podmínkám
40 - 50	76	24	izokraticky - znovuustalování

Nastříkne se 50 ml validačního roztoku, určí se píky desmopressinu a oxytocinu (první a druhý pík). Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, aby se dosáhl retenční čas pro pík desmopressinu asi 16 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi oběma píky je nejméně 1,5.

Nastříkne se 50 ml zkoušeného roztoku. Plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,5 % celkové plochy píků. Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, je nejvýše 1,5 % celkové plochy píků. Nepřihlíží se k žádnému píku rozpouštědla a k žádnému píku, jehož plocha je menší než 0,05 % hlavního píku.

Kyselina octová. 3,0 až 8,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *acetonitrilu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 80 mg *acetonitrilu R* se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,2 mol/l RS* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 20,0 mg se rozpustí ve 400 μl *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a dobře se promíchá.
Zkoušený roztok (b). 20,0 mg se rozpustí ve 400 μl roztoku vnitřního standardu a dobře se promíchá.
Porovnávací roztok. 0,100 g *kyseliny octové ledové R* se zředí roztokem vnitřního standardu na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 3 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 180 °C, teplota detektoru na 250 °C a teplota nástřikového prostoru na 200 °C.

Nastříkne se odděleně 0,5 μl až 1,0 μl zkoušeného roztoku (a), zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku.

Voda. Nejvýše 6,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu. *Použijí se suché skleněné nádoby, které mohou být silikonované.*

Roztok vnitřního standardu. 15 μl *methanolu bezvodého R* se zředí *2-propanolem R1* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 4,0 mg se rozpustí v 0,5 ml *2-propanolu R1*.
Zkoušený roztok (b). 4,0 mg se rozpustí v 0,5 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 10 μl *vody R* se smíchá s 50,0 ml roztoku vnitřního standardu (což odpovídá 2,5 % vody ve zkoušené látce).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styren-divinylbenzen kopolymerem R* (180 μm až 250 μm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- tepelně vodivostního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C, teplota detektoru na 150 °C. Nastříkne se odděleně zvolené množství zkoušeného roztoku (a), zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku. Vypočítá se obsah vody za použití předpokládané relativní hustoty vody *(2.2.5)* při 20 °C 0,9972 g/ml a nalezeného celkového obsahu vody v roztoku vnitřního standardu.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 500 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 1,0 mg se rozpustí v 2,0 ml *vody R*.

Porovnávací roztok. Obsah lahvičky *desmopressinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* na koncentraci 0,5 mg/ml.

Validační roztok. Obsah lahvičky *oxytocinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* na koncentraci 0,5 mg/ml. Smíchají se stejné objemové díly tohoto roztoku a zkoušeného roztoku.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 2,0 ml/min, kterou je směs objemových dílů mobilní fáze A a mobilní fáze B (60 + 40):
  - *mobilní fáze A - tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 (0,067 mol/l)* se zfiltruje a odplyní,
  - *mobilní fáze B* - smíchají se stejné objemové díly mobilní fáze A a *acetonitrilu pro chromatografii R*, zfiltruje se a odplyní,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 50 μl validačního roztoku, určí se píky desmopressinu a oxytocinu (první a druhý pík). Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby retenční čas píku desmopressinu byl asi 5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma píky je nejméně 1,5. Nastříkne se 50 μl zkoušeného roztoku a 50 μl porovnávacího roztoku.

Vypočítá se obsah $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$ z výšek nebo ploch hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a chromatogramu porovnávacího roztoku za použití deklarovaného obsahu $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$ v *desmopressinu CRL.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a před vlhkem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

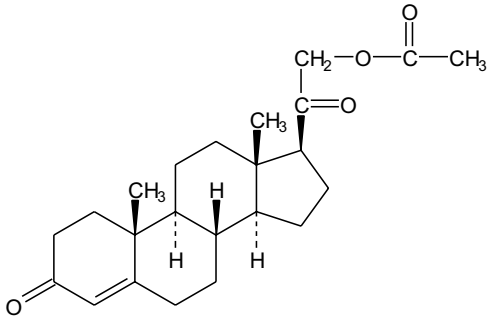
Označování

V označení na obalu se uvede:
- množství peptidu v obalu,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálního endotoxinu.

† Desoxycortoni acetas

Desoxykortonacetat

Synonymum. Desoxycortonum aceticum



$C_{23}H_{32}O_4$ M_r 372,50 CAS 56-47-3

Je to 21-hydroxy-4-pregnen-3,20-dion-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{23}H_{32}O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v propylenglykolu a v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 157 °C až 161 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *desoxykortonacetatu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *desoxykortonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kortisonacetatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 +77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se

shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo až do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění. Během 5 min se objeví žluté zabarvení. Roztok se přidá ke 2 ml *vody R* a protřepe se; výsledný roztok je intenzivně modrý a vykazuje červenou fluorescenci, která je výraznější v ultrafialovém světle při 365 nm.

E. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +171° až +179°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *desoxykortonacetatu CRL* a 2 mg *betamethason-17-valeratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 350 ml *vody R* s 600 ml *acetonitrilu R,* promíchá se a nechá se ustálit; doplní se *vodou R* na 1000 ml a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu při nastříknutí 20 μl porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: betamethason-17-valeratu asi 7,5 min, desoxykortonacetatu asi 9,5 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky betamethason-17-valeratu a desoxykortonacetatu je nejméně 4,5. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu* v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší, než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 240 nm.

Vypočítá se obsah $C_{23}H_{32}O_4$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 450.

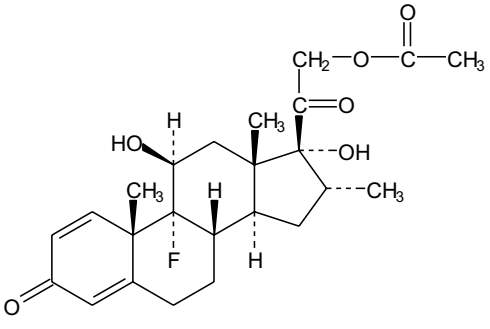
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Dexamethasoni acetas

Dexamethasonacetat



$C_{24}H_{31}FO_6$ M_r 434,50 CAS 1177-87-3

Je to 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{24}H_{31}FO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%, těžce rozpustný v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.

Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zkumavky se zabroušenou zátkou, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, promíchá se, zahřívá 20 min ve vodní lázni při 60 °C a ihned se ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 419 nm není menší než 0,35.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dexamethasonacetatu CRL*. Jestliže spektra v pevném stavu jsou rozdílná, zaznamenají se spektra nasycených roztoků (asi 30 g/l) zkoušené látky a referenční látky v *chloroformu R* za použití 0,2mm kyvet.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *dexamethasonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kortisonacetatu R* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo až do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění. Během 5 min se objeví slabé červenohnědé zbarvení. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a roztok zůstane čirý.

E. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Po ochlazení se přidá 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do získání bezbarvé směsi a zfiltruje se. K čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS* se přidá 1,0 ml filtrátu, promíchá se a nechá se 5 min stát. Současně se stejným způsobem připraví slepá zkouška. Roztok získaný se zkoušenou látkou je žlutý, roztok získaný se slepou zkouškou je červený.

F. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +84° až +90°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v asi 4 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *dexamethasonacetatu CRL* a 2 mg *betamethasonacetatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 380 ml *acetonitrilu R* s 550 ml *vody R,* promíchá se a nechá se ustálit; doplní se na 1000 ml *vodou R* a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu získaného nastříknutím 20 μl porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: betamethasonacetatu asi 19 min, dexamethasonacetatu asi 22 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky dexamethasonacetatu a betamethasonacetatu není menší než 3,3. V případě potřeby se upraví koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší, než je 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší ve vakuové sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238,5 nm.

Vypočítá se obsah $C_{24}H_{31}FO_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 357.

Uchovávání

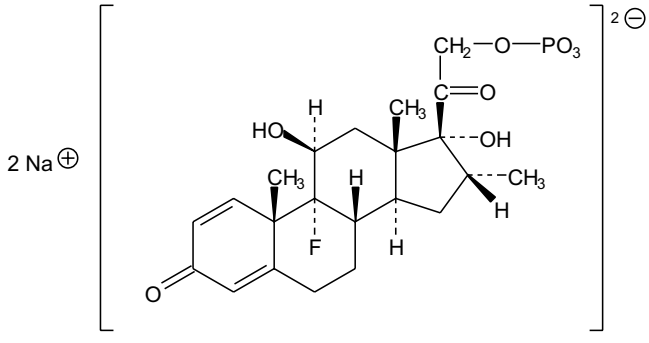
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Dexamethasoni natrii phosphas

1998

Sodná sůl dexamethasonfosfatu



$C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ M_r 516,41 CAS 2392-39-4

Je to disodná sůl 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-dihydrogenfosfatu. Počítáno na bezvodou a ethanolu prostou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý velmi hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru a v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *ethanolem R* na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do skleněné zkumavky se zabroušenou zátkou, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 419 nm není větší než 0,20.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli dexamethasonfosfatu CRL*. Pokud spektra získaná v pevném stavu vykazují rozdíly, odděleně se zkoušená látka a referenční látka rozpustí v co nejmenším objemu *lihu 96% R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a znovu se zaznamenají spektra obou látek.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sodné soli dexamethasonfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *sodné soli prednisolonfosfatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové R, vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě skvrny, které nemusí být zcela odděleny.

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne slabé žlutohnědé zbarvení. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok.

E. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se vychladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* tak, aby roztok zůstal bezbarvý. Zfiltruje se a 1 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanu-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se a nechá se stát 5 min. Současně se stejným způsobem provede slepá zkouška. Roztok se zkoušenou látkou je zbarven žlutě, kontrolní roztok získaný při slepé zkoušce je červený.

F. K asi 40 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a směs se opatrně zahřívá až do vzniku bílého dýmu, pak se za současného zahřívání přidává po kapkách *kyselina dusičná R*, až je výsledný roztok téměř bezbarvý. Po ochlazení se přidají 2 ml *vody R* a opakuje se zahřívání až do vzniku bílého dýmu. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a roztok se neutralizuje *amoniakem zředěným RS1* na *papír lakmusový červený R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce na sodík *(2.3.1)* a zkoušce na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zabarven než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,5; měří se roztok připravený zředěním 1 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 5 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +75° až +83°, počítáno na bezvodou a ethanolu prostou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *sodné soli dexamethasonfosfatu CRL* a 2 mg *sodné soli betamethasonfosfatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí připravenou takto: do 250ml kuželové baňky se naváží 1,360 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 0,600 g *hexylaminu R*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Potom se směs rozpustí v 182,5 ml *vody R*, přidá se 67,5 ml *acetonitrilu R*, promíchá se a zfiltruje se (0,45 μm). Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu s 20 μl porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: sodné soli betamethasonfosfatu asi 12,5 min, sodné soli dexamethasonfosfatu asi 14 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky sodné soli dexamethasonfosfatu a sodné soli betamethasonfosfatu je nejméně 2,2. V případě potřeby se sníží se koncentrace *acetonitrilu R* nebo se zvýší koncentrace *vody R* v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Anorganické fosforečnany. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R*, promíchá se a nechá se 5 min stát. Žluté zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku fosforečnanů (5 μg PO_4/ml)* (1 %).

Ethanol. Nejvýše 3,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 ml *1-propanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v 5,0 ml vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 g *ethanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 2,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1 m a vnitřního průměru 3,2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota nástřikového prostoru na 250 °C, teplota detektoru na 280 °C. Nastříkne se odděleně po 2 μl každého roztoku.

Ethanol a voda. Součet obsahu vody a ethanolu není větší než 13,0 %. Provede se semimikrostanovení vody *(2.5.12)* s 0,200 g zkoušené látky. K obsahu vody se připočítá obsah ethanolu ze zkoušky Ethanol, vyjádřený v procentech.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 500,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241,5 nm.

Vypočítá se obsah $C_{22}H_{28}FNa_2O_8$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 303.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

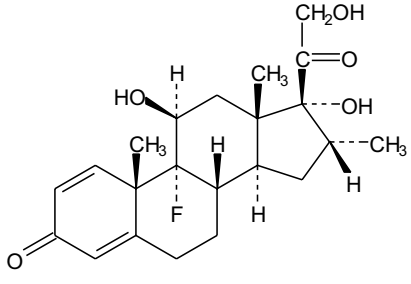
A. dexamethason,

B. sodná sůl betamethasonfosfatu.

† Dexamethasonum

1998

Dexamethason



$C_{22}H_{29}FO_5$ M_r 392,47 CAS 50-02-2

Je to 9-fluor-11β,17,21-trihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{22}H_{29}FO_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu.

Taje při asi 255 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.

Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zkumavky se zabroušenou zátkou, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*,

promíchá se, zahřívá 20 min ve vodní lázni při 60 °C a ihned se ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 419 nm není menší než 0,4.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dexamethasonu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *dexamethasonu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *betamethasonu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min při 120 °C nebo až do objevení skvrn. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě skvrny, které nemusí být zcela oddělené.

D. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Po ochlazení se přidá 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do získání bezbarvé směsi a zfiltruje se. K čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS* se přidá 1,0 ml filtrátu, promíchá se a nechá se 5 min stát. Současně se stejným způsobem připraví slepá zkouška. Roztok získaný se zkoušenou látkou je žlutý, roztok získaný slepou zkouškou je červený.

E. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění. Během 5 min se objeví slabé červenohnědé zabarvení. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +75° až +80°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v roztoku *acetonitrilu R* 50% (*V/V*) v *methanolu R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *dexamethasonu CRL* a 2 mg *methylprednisolonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází A na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé o vnitřním průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 2,5 ml/min s lineárním gradientovým programem za použití následujících podmínek:
  - *mobilní fáze A* - v odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 250 ml *acetonitrilu R* se 700 ml *vody R*, nechá se ustálit, doplní se *vodou R* na 1000 ml a opět se promíchá,
  - *mobilní fáze B - acetonitril R*,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0	100	0	izokraticky
15	100 → 0	0 → 100	počátek lineárního gradientu
40	0	100	konec chromatogramu návrat na 100 A
41	100	0	počátek ustalování s A
46 = 0	100	0	konec ustalování počátek dalšího chromatogramu

Teplota kolony se udržuje na 45 °C. Kolona se ustaluje mobilní fází B při průtokové rychlosti 2,5 ml/min po dobu nejméně 30 min a potom mobilní fází A po dobu 5 min. Pro následující chromatogramy se použijí podmínky popsané mezi 40. min až 46. min.

Zvolí se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu při nastříknutí 20 μl porovnávacího roztoku (b) činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a při zaznamenání chromatogramu za výše popsaných podmínek retenční časy látek jsou: methylprednisolonu asi 11,5 min a betamethasonu asi 13 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky methylprednisolonu a betamethasonu není menší než 2,8. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi A.

Nastříkne se odděleně po 20 μl roztoku *acetonitrilu R* 50% (*V/V*) v *methanolu R* jako slepá zkouška, 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238,5 nm.

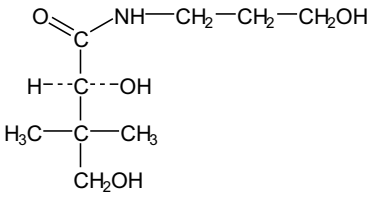
Vypočítá se obsah $C_{22}H_{29}FO_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 394.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Dexpanthenolum

Dexpanthenol



$C_9H_{19}NO_4$ M_r 205,25 CAS 81-13-0

Je to (*R*)-2,4-dihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutyramid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{19}NO_4$.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo slabě nažloutlá viskózní hygroskopická kapalina nebo bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dexpanthenolu CRL*. Tablety se připraví odděleně nanesením 0,05 ml roztoku zkoušené látky (50 g/l) v *ethanolu R* a 0,05 ml roztoku referenční látky (50 g/l) v *ethanolu R* na tablety *bromidu draselného R* a sušením tablet při 100 °C až 105 °C po dobu 15 min.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce 3-Aminopropanol, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,1 ml *síranu měďnatého RS;* vzniká modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,500 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_6 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. Nejvýše 10,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +29,0° až +32,0°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

3-Aminopropanol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *dexpanthenolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *3-aminopropanolu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methanolu R* a *1-butanolu R* (20 + 25 + 55) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny trichloroctové R* (100 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se 10 min při 150 °C. Pak se vrstva postříká roztokem *ninhydrinu R* (1 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se při 120 °C do vzniku barevných skvrn. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající 3-aminopropanolu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,0 %, stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,400 g se přidá 50,0 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* a vaří se 5 h pod zpětným chladičem za chránění před vlhkostí. Po ochlazení se přidá 50 ml *dioxanu R*, kterým se nejprve opláchne chladič, za chránění před vlhkostí. Přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *hydrogenftalanem draselným 0,1 mol/l VS* do změny zeleného zbarvení na žluté. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,53 mg $C_9H_{19}NO_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Dextranum 40 pro iniectione

Dextran 40 na injekci

Synonymum. Dextranum 40 ad iniectabile

CAS 9004-54-0

Je to směs polysacharidů převážně α-1,6-glukonového typu získaná hydrolýzou a frakcionací dextranů vyrobených fermentací sacharosy s použitím kmenu *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 nebo některého podkmenu (např. *L. mesenteroides* B-512F = NCTC 10817).

Vyrábí se v podmínkách minimalizujících mikrobiální kontaminaci.

Průměrná relativní molekulová hmotnost je asi 40 000.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v etheru, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* zahřátím na vodní lázni a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* tohoto roztoku je +195° až +201°, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dextranu CRL.*

C. Zkouška Distribuce molekulových hmotností, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* zahřátím na vodní lázni a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok zůstane bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok se zbarví červeně nebo oranžově.

Látky obsahující dusík. Provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou *(2.5.9)* za použití 0,200 g zkoušené látky a zahřívání po dobu 2 h. Destilát se jímá do směsi 0,5 ml *zeleně bromkresolové RS,* 0,5 ml *červeně methylové RS* a 20 ml *vody R.* Titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l VS.* Ke změně barvy indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Zbytková rozpouštědla. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok. 5 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a destiluje se. Jímá se prvních 45 ml destilátu, přidá se 1 ml roztoku *1-propanolu R* (25 g/l) a zředí se *vodou R* na 50 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml roztoku *ethanolu R* (25 g/l), 0,5 ml roztoku *1-propanolu R* (25 g/l) a 0,5 ml roztoku *methanolu R* (2,5 g/l) se smíchá a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 150 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 25 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 190 °C, teplota nástřikového prostoru je 240 °C a teplota detektoru je 210 °C. Nastříkne se zvolený objem každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píků odpovídajících methanolu nebo ethanolu není větší než plocha odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 % ethanolu a 0,05 % methanolu) a součet ploch všech píků, kromě píků ethanolu, methanolu a vnitřního standardu, není větší než plocha píku vnitřního standardu (0,5 % počítáno jako 1-propanol).

Distribuce molekulových hmotností *(2.2.39)*. Průměrná molekulová hmotnost (M_w) je 35 000 až 45 000. Průměrná molekulová hmotnost 10 % vysokomolekulární frakce není větší než 110 000. Průměrná molekulová hmotnost 10 % nízkomolekulární frakce není nižší než 7000.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 7,0 %; 0,200 g se suší 5 h v sušárně při (105 ± 2) °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 10 m.j. endotoxinů v gramu.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou *(2.6.12)*. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Dextranum 60 pro iniectione

Dextran 60 na injekci

Synonymum. Dextranum 60 ad iniectabile

CAS 9004-54-0

Je to směs polysacharidů převážně α-1,6-glukonového typu získaná hydrolýzou a frakcionací dextranů vyrobených fermentací sacharosy s použitím kmenu *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 nebo některého podkmenu (např. *L. mesenteroides* B-512F = NCTC 10817).

Vyrábí se za podmínek minimalizujících mikrobiální kontaminaci.

Průměrná relativní molekulová hmotnost je asi 60 000.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v etheru, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* zahřátím na vodní lázni a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* tohoto roztoku je +195° až +201°, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dextranu CRL.*

C. Zkouška Distribuce molekulových hmotností, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* zahřátím na vodní lázni a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok zůstane bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok se zbarví červeně nebo oranžově.

Látky obsahující dusík. Provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou *(2.5.9)* za použití 0,200 g zkoušené látky a zahřívání po dobu 2 h. Destilát se jímá do směsi 0,5 ml *zeleně bromkresolové RS,* 0,5 ml *červeně methylové RS* a 20 ml *vody R.* Titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l VS.* Ke změně barvy indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Zbytková rozpouštědla. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok. 5 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a destiluje se. Jímá se prvních 45 ml destilátu, přidá se 1 ml roztoku *1-propanolu R* (25 g/l) a zředí se *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml roztoku *ethanolu R* (25 g/l), 0,5 ml roztoku *1-propanolu R* (25 g/l) a 0,5 ml roztoku *methanolu R* (2,5 g/l) se smíchá a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 150 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 25 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 190 °C, teplota nástřikového prostoru je 240 °C a teplota detektoru je 210 °C. Nastříkne se zvolený objem každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píků odpovídajících methanolu nebo ethanolu není větší než plocha odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 % ethanolu a 0,05 % methanolu) a součet ploch všech píků, kromě píků ethanolu, methanolu a vnitřního standardu, není větší než plocha píku vnitřního standardu (0,5 % počítáno jako 1-propanol).

Distribuce molekulových hmotností *(2.2.39)*. Průměrná molekulová hmotnost *(M_w)* je 54 000 až 66 000. Průměrná molekulová hmotnost 10 % vysokomolekulární frakce není větší než 180 000. Průměrná molekulová hmotnost 10 % nízkomolekulární frakce není nižší než 14 000.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 7,0 %; suší se 0,200 g 5 h v sušárně při (105 ± 2) °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 16 m.j. endotoxinů v gramu.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou *(2.6.12)*. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Dextranum 70 pro iniectione

Dextran 70 na injekci

CAS 9004-54-0

Je to směs polysacharidů převážně α-1,6-glukonového typu získaná hydrolýzou a frakcionací dextranů vyrobených fermentací sacharosy s použitím kmenu *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 nebo některého podkmenu (např. *L. mesenteroides* B-512F = NCTC 10817).

Vyrábí se za podmínek minimalizujících mikrobiální kontaminaci.

Průměrná relativní molekulová hmotnost je asi 70 000.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v etheru, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* zahřátím na vodní lázni a zředí se stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* tohoto roztoku je +195° až +201°, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dextranu CRL.*

C. Zkouška Distribuce molekulových hmotností, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* zahřátím na vodní lázni a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok zůstane bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok se zbarví červeně nebo oranžově.

Látky obsahující dusík. Provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou *(2.5.9)* za použití 0,200 g zkoušené látky a zahřívání po dobu 2 h. Destilát se jímá do směsi 0,5 ml *zeleně bromkresolové RS,* 0,5 ml *červeně methylové RS* a 20 ml *vody R.* Titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l VS.* Ke změně barvy indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Zbytková rozpouštědla. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok. 5 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a destiluje se. Jímá se prvních 45 ml destilátu, přidá se 1 ml roztoku *1-propanolu R* (25 g/l) a zředí se *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml roztoku *ethanolu R* (25 g/l), 0,5 ml roztoku *1-propanolu R* (25 g/l) a 0,5 ml roztoku *methanolu R* (2,5 g/l) se smíchá a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 150 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 25 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 190 °C, teplota nástřikového prostoru je 240 °C a teplota detektoru je 210 °C. Nastříkne se zvolený objem každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píků odpovídajících methanolu nebo ethanolu není větší než plocha odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 % ethanolu a 0,05 % methanolu) a součet ploch všech píků, kromě píků ethanolu, methanolu a vnitřního standardu, není větší než plocha píku vnitřního standardu (0,5 %, počítáno jako 1-propanol).

Distribuce molekulových hmotností *(2.2.39)*. Průměrná molekulová hmotnost *(M_w)* je 64 000 až 76 000. Průměrná molekulová hmotnost 10 % vysokomolekulární frakce není větší než 185 000. Průměrná molekulová hmotnost 10 % nízkomolekulární frakce není nižší než 15 000.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 7,0 %; 0,200 g se suší 5 h v sušárně při (105 ± 2) °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 16 m.j. endotoxinů v gramu.

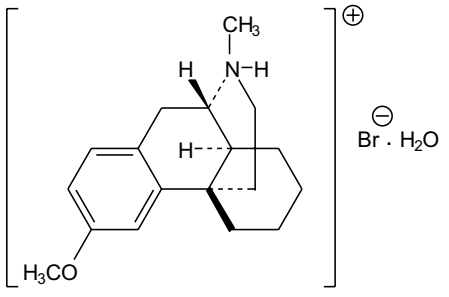
Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou *(2.6.12)*. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Dextromethorphani hydrobromidum

Dextromethorfaniumbromid



$C_{18}H_{26}BrNO \cdot H_2O$ M_r 370,33 CAS 6700-34-1

M_r bezvodého 352,31

Je to monohydrát (9*S*,13*S*,14*S*)-3-methoxy-17-methylmorfinaniumbromidu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{26}BrNO$.

Vlastnosti

Téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 125 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dextromethorfaniumbromidu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,4 g se rozpustí mírným zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, ochladí se a zředí se jí na 20 ml. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidáním nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na červené.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +28° až +30°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,200 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním jí na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *dextromethorfaniumbromidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, dichlormethanu R, methanolu R, ethylacetatu R* a *toluenu R* (2 + 10 + 13 + 20 + 55) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným RS2* a potom *peroxidem vodíku zředěným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %).

N,N-Dimethylanilin. Nejvýše 10 μg/g. 0,5 g se rozpustí zahřátím ve 20 ml *vody R*. Po ochlazení se přidají 2 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 1 ml roztoku *dusitanu sodného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 25 ml. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 20 ml roztoku *dimethylanilinu R* (0,25 mg/l).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,0 % až 5,5 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 20 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,23 mg $C_{18}H_{26}BrNO$.

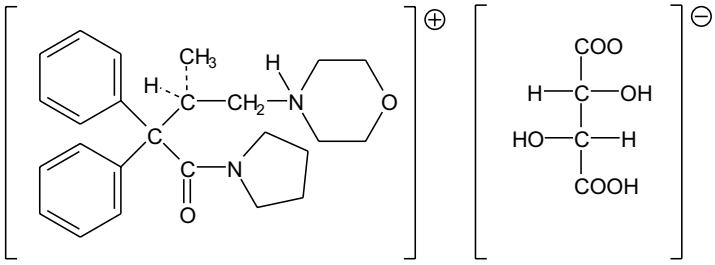
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

§§ Dextromoramidi hydrogenotartras

Dextromoramidiumhydrogentartarat

Synonymum. Dextromoramidi tartras



$C_{29}H_{38}N_2O_8$ M_r 542,63 CAS 2922-44-3

Je to (*R*)-N-[3,3-difenyl-2-methyl-4-(1-pyrrolidinyl)-4-oxo]butylmorfolinium-(2*R*,3*R*)-hydrogentartarat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{29}H_{38}N_2O_8$.

Vlastnosti

Bílý amorfní nebo krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Taje při asi 190 °C, za mírného rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. 75 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maxima při 254 nm, 259 nm a 264 nm. Specifická absorbance v těchto maximech je asi 6,9, 7,7 a 6,5.

B. Asi 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidají 3 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a zahřeje se na vodní lázni; vznikne šedá nebo černá sraženina.

C. Vyhovuje zkoušce (b) na vínany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 4,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,2 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +21° až +23°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se *methanolem R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,15 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,05 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,05 mol/l VS* odpovídá 27,13 mg $C_{29}H_{38}N_2O_8$.

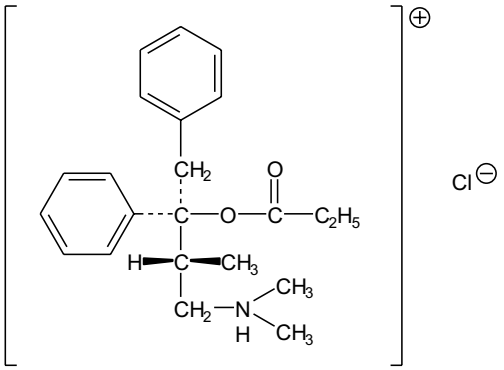
Uchovávání

Omamná látka.

§§ Dextropropoxypheni hydrochloridum

Dextropropoxyfeniumchlorid

Synonymum. Dextropropoxyphenium chloratum



$C_{22}H_{30}ClNO_2$ M_r 375,94 CAS 1639-60-7

Je to (1*S*,2*R*)-(3,4-difenyl-2-methyl-3-propionyloxybutyl)dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{30}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 165 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 360 nm. Roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 252 nm, 257 nm a 263 nm, a dvě prodlevy: při 240 nm a 246 nm. Poměr absorbance v maximu při 257 nm k absorbanci v maximu při 252 nm je 1,22 až 1,28. Poměr absorbance v maximu při 257 nm k absorbanci v maximu při 263 nm je 1,29 až 1,35. Zkoušku lze hodnotit, jestliže ve zkoušce rozlišení *(2.2.25)* poměr absorbancí není menší než 1,5.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. dextropropoxyfeniumchloridu.*

D. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 30 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +52° až +57°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,50 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg se rozpustí v 2,5 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS*, přidá se 2,5 ml *vody R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Potom se přidá 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se mobilní fází na 50 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,125 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 µm),
- předkolony naplněné vhodným silikagelem, ustálené mobilní fází a umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,5 (0,2 mol/l), tetrahydrofuranu R, methanolu R* a *vody R* (50 + 84 + 350 + 516) obsahující *cetyltrimethylamoniumbromid R* (0,9 g/l), průtoková rychlost je 1,0 ml/ml,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm,
- injektorové smyčky.

Chromatografický systém se ustaluje promýváním mobilní fází po dobu 16 h (po 6 h může být mobilní fáze recirkulovaná).

Nastříkne se po 20 µl každého roztoku; chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) poměr signálu píku k šumu je nejméně 5, na chromatogramu porovnáva

cího roztoku (b) jsou dva píky a rozlišení mezi těmito píky je nejméně 2,0. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,270 g se rozpustí v 60 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml roztoku *zeleně malachitové R* (5 g/l) v *acetanhydridu R* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,59 mg $C_{22}H_{30}ClNO_2$.

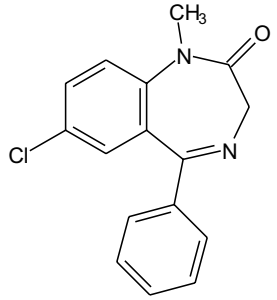
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Omamná látka.

§ Diazepamum

Diazepam



$C_{16}H_{13}ClN_2O$ M_r 284,74 CAS 439-14-5

Je to 5-fenyl-7-chlor-1-methyl-2,3-dihydro-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{13}ClN_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 131 °C až 135 °C.

B. *Roztoky je nutno chránit před světlem, absorbance se měří ihned po přípravě roztoků.*

25 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* (5 g/l) v *methanolu R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 250,0 ml (roztok A). 5,0 ml roztoku A se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 330 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima: při 242 nm a 285 nm. Specifická absorbance v maximu při 242 nm je asi 1020. 25,0 ml roztoku A se zředí roztokem *kyseliny sírové R* (5 g/l) v *methanolu R* na 100,0 ml. Měří se absorbance při 325 nm až 400 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 366 nm. Specifická absorbance v maximu je 140 až 155.

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 3 ml *kyseliny sírové R.* Roztok v ultrafialovém světle při 365 nm zelenožlutě fluoreskuje.

D. K 80 mg v porcelánovém kelímku se přidá 0,3 g *uhličitanu sodného bezvodého R,* zahřívá se 10 min nad plamenem a nechá se vychladnout. Zbytek se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky a rozkladné produkty. *Zkouška se provádí za chránění před světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. Připraví se v čas potřeby.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *hexanu R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuové sušárně při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

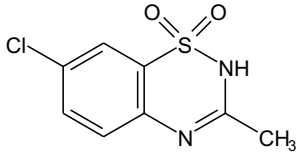
0,500 g se rozpustí v 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,3 ml *modři nilské A RS* jako indikátoru do žlutozeleného zbarvení.
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,47 mg $C_{16}H_{13}ClN_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

† Diazoxidum

Diazoxid



$C_8H_7ClN_2O_2S$ M_r 230,67 CAS 364-98-7

Je to 7-chlor-3-methyl-2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid.
Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_7ClN_2O_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný nebo krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se velmi snadno ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25)* roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje maximum při 280 nm a prodlevu při 304 nm. Specifická absorbance v maximu je 570 až 610.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *diazoxidu CRL.* Měří se tablety látek s *bromidem draselným R.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm; hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 20 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R*, přidá se 0,1 g *zinku práškového R*, 5 min se vaří a po ochlazení se zfiltruje. K filtrátu se přidají 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l) a promíchá se. Nechá se 1 min stát a přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l); vzniká červené nebo fialově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,4 g se rozpustí ve 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 0,5 g upráškované zkoušené látky se přidá 30 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 2 min se protřepává a potom se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,2 ml

hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS a 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí ve směsi 0,5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1 ml *methanolu R* a zředí se *methanolem R* na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 9) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 9) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *diazoxidu CRL* se rozpustí ve směsi 0,5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1 ml *methanolu R* a zředí se *methanolem R* na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methanolu R* a *chloroformu R* (7 + 25 + 68) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí mírným zahřátím v 50 ml směsi objemových dílů *vody R* a *dimethylformamidu R* (1 + 2) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Provede se slepá zkouška.

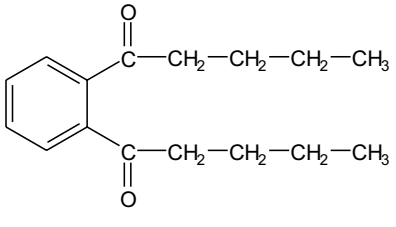
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,07 mg $C_8H_7ClN_2O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Dibutylis phthalas

Dibutylftalat



$C_{16}H_{22}O_4$ M_r 278,35 CAS 84-74-2

Je to dibutylester kyseliny 1,2-benzendikarboxylové. Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{22}O_4$.

Vlastnosti

Čirá olejovitá kapalina. Je bezbarvý nebo velmi slabě nažloutlý, prakticky nerozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,043 až 1,048.

B. Index lomu *(2.2.6)*. 1,490 až 1,495.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dibutylftalatu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *etheru R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *dibutylftalatu CRL* se rozpustí v *etheru R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *heptanu R* a *etheru R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

E. K asi 0,1 ml se přidá 0,25 ml *kyseliny sírové R* a 50 mg *resorcinolu R,* zahřívá se 5 min ve vodní lázni. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* roztok se zbarví žlutě nebo hnědožlutě a vykazuje zelenou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 20,0 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného po přidání *fenolftaleinu RS1* a přidá se 0,2 ml *fenolftaleinu RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,50 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *bibenzylu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 60 mg *bibenzylu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R,* přidají se 2,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlormethanem R* na 20,0 ml.
Porovnávací roztok. K 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlormethanem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (150 μm až 180 μm), impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 190 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 225 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Látky se eluují v pořadí: bibenzyl a dibutylftalat. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška píku bibenzylu nebyla menší než 70 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky bibenzylu a dibutylftalatu je nejméně 12.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku (a). Na chromatogramu se ověří, že se zde nevyskytuje žádný pík se stejným retenčním časem, jaký má vnitřní standard.

Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku (b) a 1 μl porovnávacího roztoku. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času píku dibutylftalatu, který je asi 12 min. Na chromatogramu porovnávacího roztoku se vypočítá poměr (*R*) plochy píku dibutylftalatu k ploše píku vnitřního standardu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není poměr součtu ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku vnitřního standardu a píku rozpouštědla, k ploše píku vnitřního standardu větší než *R* (1,0 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 10,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,750 g se vpraví do 250ml baňky z borosilikátového skla, přidá se 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS,* několik skleněných kuliček a zahřívá se 1 h na vodní lázni pod zpětným chladičem. Potom se přidá 1 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se ihned *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do odbarvení červeného zbarvení. Provede se slepá zkouška. Vypočítá se spotřeba *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* potřebného ke zmýdelnění.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* odpovídá 69,59 mg $C_{16}H_{22}O_4$.

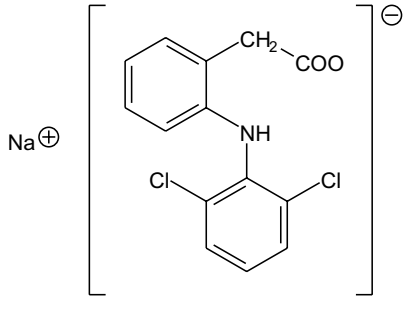
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Separandum.

† Diclofenacum natricum

Sodná sůl diklofenaku



$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ M_r 318,13 CAS 15307-79-6

Je to sodná sůl kyseliny 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je slabě hygroskopická, mírně rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v methanolu, dobře rozpustná v lihu 96%, těžce rozpustná v acetonu a prakticky nerozpustná v etheru.

Taje při asi 280 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sodné soli diklofenaku CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli diklofenaku CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *indometacinu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 2 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml směsi stejných objemových dílů roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (6 g/l) a roztoku *chloridu železitého R* (9 g/l), připravené v čas potřeby. Roztok se nechá 5 min stát, chráněn před světlem. Přidají se 3 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) a roztok se nechá 15 min stát chráněn před světlem; vzniká modré zbarvení a tvoří se sraženina.

D. 60 mg se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R* a přidá se 0,5 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (b) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a jeho absorbance *(2.2.25)* měřená při 440 nm není větší než 0,05.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 mg *diklofenaku nečistoty A CRL* se rozpustí v *methanolu R*, přidá se 1,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* s vysycenými zbytkovými silanoly (5 μm),

- mobilní fáze, která je směsí připravenou takto: použije se směs 34 objemových dílů směsi stejných objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné R* (1 g/l) a roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (1,6 g/l), jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 2,5, a 66 objemových dílů *methanolu R,* průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: diklofenaku asi 25 min; diklofenaku nečistoty A asi 12 min. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času sodné soli diklofenaku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píky diklofenaku a diklofenaku nečistoty A je nejméně 6,5.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy (*2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

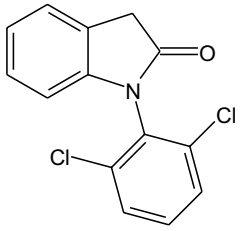
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,81 mg $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$.

Uchovávání

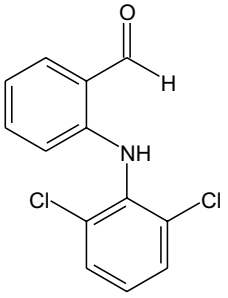
Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Separandum.

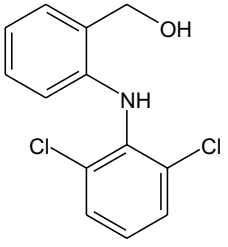
Nečistoty



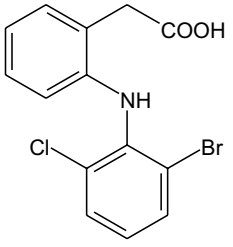
A. 1-(2,6-dichlorfenyl)-2-indolinon,



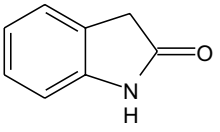
B. 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]benzaldehyd,



C. {2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}methanol,



D. kyselina 2-{2-[(2-brom-6-chlorfenyl)amino]fenyl}octová,

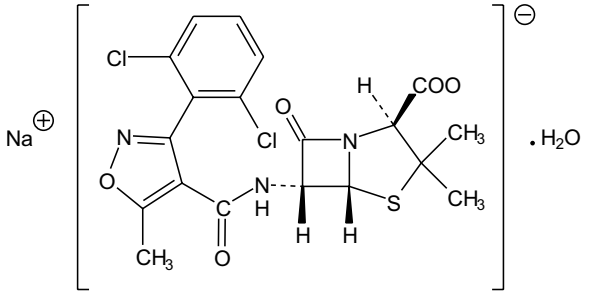


E. 2-indolinon.

† Dicloxacillinum natricum

1998

Sodná sůl dikloxacilinu



$C_{19}H_{16}Cl_2N_3NaO_5S$. H_2O M_r 510,32 CAS 13412-64-1

M_r bezvodé 492,31

Je to monohydrát sodné soli kyseliny (6*R*)-6-[3-(2,6-dichlorfenyl)-5-methyl-4-isoxazolylkarboxamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{16}Cl_2N_3NaO_5S$.

Výroba

Pokud se vyrábí způsobem, který může v látce zanechat zbytky kyseliny 2-ethylhexanové, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,8 %, stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, hygroskopický. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sodné soli dikloxacilinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného H R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli dikloxacilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *sodné soli kloxacilinu CRL*, 25 mg *sodné soli dikloxacilinu CRL* a 25 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou*

ledovou R na 5,0, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky dlouhé asi 150 mm a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je slabě zelenožlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; roztok zežloutne.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) roztoku S při 430 nm je nejvýše 0,04.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +128° až +143°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na získaném chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se zkoušený roztok (a) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než pětinásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (5,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a 1 min se intenzivně třepe. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se ve zkumavce se zábrusem přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a 1 min se intenzivně třepe. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 µl roztoku zkoušené látky a 1 µl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 4,5 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku ve *vodě na injekci R* obsahujícího 20 mg zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *sodné soli dikloxacilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5,0 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* a 5,0 mg *sodné soli dikloxacilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min. Je to směs objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (2,7 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 5,0, a *acetonitrilu R* (75 + 25),
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Nastříkne se porovnávací roztok (c). Zaznamená-li se chromatogram za předepsaných podmínek, je retenční čas dikloxacilinu asi 10 min. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavních píků na chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (flukloxacilin) a druhým píkem (dikloxacilin) je nejméně 2,5. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže směrodatná relativní odchylka plochy píku dikloxacilinu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Uchovávání

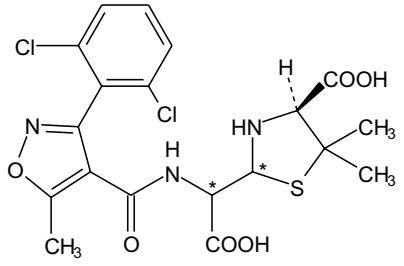
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

Separandum.

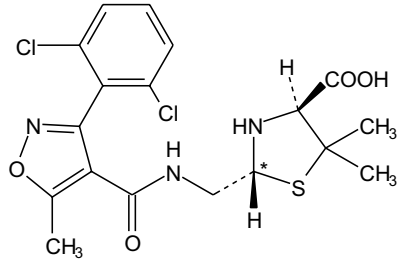
Označování

V označení se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

Nečistoty

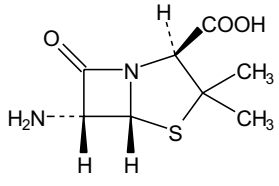


A. kyselina(4*S*)-2-{karboxy[[[3-(2,6-dichlorfenyl)-5-methylisoxazol-4-yl]karbonyl]amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (kyseliny penicilové dikloxacilinu),

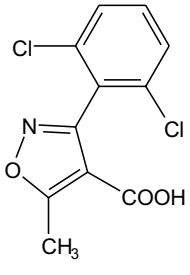


a epimer k C*

B. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[[[3-(2,6-dichlorfenyl)-5-methylisoxazol-4-yl]karbonyl]amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny dikloxacilinu),



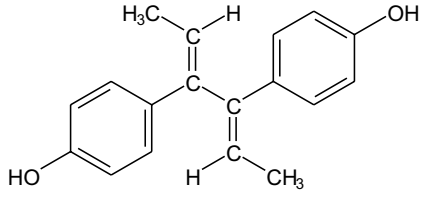
C. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



D. kyselina 3-(2,6-dichlorfenyl)-5-methylisoxazol-4-karboxylová.

† Dienestrolum

Dienestrol



$C_{18}H_{18}O_2$ M_r 266,34 CAS 84-17-3

Je to (*E*,*E*)-4,4′-(1,2-diethylidenethylen)difenol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{18}H_{18}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dienestrolu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 1 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 1 ml 1% *(V/V)* roztoku *bromu R* v *kyselině octové ledové R* a zahřívá se 2 min ve vodní lázni. 0,5 ml tohoto roztoku se vpraví do suché zkumavky, přidá se 0,5 ml *ethanolu R,* promíchá se a přidá se 10 ml *vody R;* vznikne červenofialové zbarvení. Pak se přidá 5 ml *chloroformu R*, silně se protřepe a vrstvy se nechají oddělit; chloroformová vrstva je červeně zbarvená a vodná vrstva je téměř bezbarvá.

D. Asi 0,5 mg se rozpustí v 0,2 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 1 ml *kyseliny fosforečné R* a 3 min se zahřívá na vodní lázni; vznikne červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Teplota tání *(2.2.14)*. 227 °C až 234 °C, přičemž interval mezi úplným vznikem menisku a roztavením posledních částic látky není větší než 3 °C.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R.*
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *dienestrolu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *diethylstilbestrolu CRL* se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min při 120 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou nejméně dvě zřetelně oddělené přibližně stejně intenzivní skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

25,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *ethanolu R* a zředí se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 250,0 ml. Stejným postupem se připraví porovnávací roztok za použití 25,0 mg *dienestrolu CRL*. Změří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 245 nm.

Obsah $C_{18}H_{18}O_2$ se vypočítá za použití zjištěných hodnot absorbancí zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a jejich koncentrací.

Uchovávání

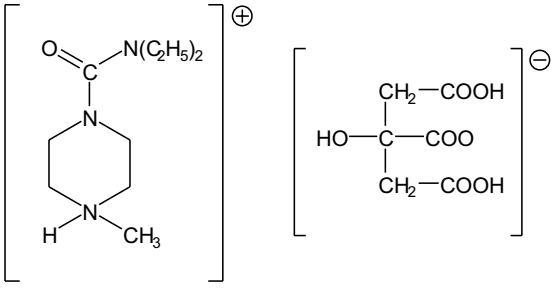
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

---

† Diethylcarbamazini dihydrogenocitras

Diethylkarbamaziniumdihydrogencitrat

Synonyma. Diethylcarbamazini citras, Diethylcarbamazinium citricum, Diaethylcarbamazinium dihydrogencitricum, citronan diethylkarbamazinia



$C_{16}H_{29}N_3O_8$ M_r 391,42 CAS 1642-54-2

Je to 1-diethylkarbamoyl-4-methylpiperaziniumdihydrogencitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{29}N_3O_8$.

Vlastnosti

Bílý krystalický slabě hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru.

Taje při asi 138 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *diethylkarbamaziniumdihydrogencitratu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Dimethylpiperazin a methylpiperazin, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce na citronany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se třepe s *vodou R* do rozpuštění a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Dimethylpiperazin a methylpiperazin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *diethylkarbamaziniumdihydrogencitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 2,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *methylpiperazinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *dimethylpiperazinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *2-butanonu R* a *methanolu R* (5 + 30 + 65) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a na 30 min se vystaví parám jodu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádné skvrny odpovídající methylpiperazinu a dimethylpiperazinu nejsou intenzivnější než skvrny na chromatogramech porovnávacího roztoku (b) a (c) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 10 ml základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,00 g se suší 4 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí ve 25 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 25 ml *acetanhydridu R* a 0,2 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zelenavě modrého zbarvení.

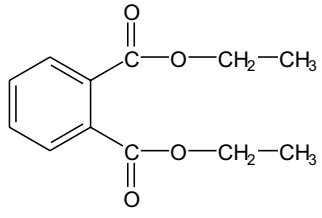
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 39,14 mg $C_{16}H_{29}N_3O_8$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

Diethylis phthalas

Diethylftalat



$C_{12}H_{14}O_4$ M_r 222,24 CAS 84-66-2

Je to diethylester kyseliny benzen-1,2-dikarboxylové.
Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{14}O_4$.

Vlastnosti

Čirá olejovitá bezbarvá nebo velmi slabě nažloutlá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,117 až 1,121.

B. Index lomu *(2.2.6)*. 1,500 až 1,505.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *diethylftalatu CRL*. Měří se jako tenký film.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *etheru R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *diethylftalatu CRL* se rozpustí v *etheru R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *heptanu R* a *etheru R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

E. K asi 0,1 ml se přidá 0,25 ml *kyseliny sírové R* a 50 mg *resorcinolu R,* zahřívá se 5 min na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* roztok se zbarví žlutě nebo hnědožlutě a vykazuje zelenou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 20,0 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného po přidání *fenolftaleinu RS1* a přidá se 0,2 ml *fenolftaleinu RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 60 mg *naftalenu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R,* přidají se 2,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlormethanem R* na 20,0 ml.
Porovnávací roztok. K 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlormethanem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (150 μm až 180 μm), impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru na 225 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Látky se eluují v pořadí: naftalen a diethylftalat. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška píku naftalenu nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky naftalenu a diethylftalatu není menší než 10.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku (a). Na chromatogramu se ověří, že se zde nevyskytuje žádný pík se stejným retenčním časem, jaký má vnitřní standard.

Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku (b) a 1 μl porovnávacího roztoku. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času píku diethylftalatu. Z chromatogramu porovnávacího roztoku se vypočítá poměr (*R*) plochy píku diethylftalatu k ploše píku vnitřního standardu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) není poměr součtu ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku vnitřního standardu a píku rozpouštědla, k ploše píku vnitřního standardu větší než *R* (1,0 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,750 g se vpraví do 250ml baňky z borosilikátového skla, přidá se 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS,* několik skleněných kuliček a zahřívá se 1 h na vodní lázni pod zpětným chladičem. Potom se přidá 1 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se ihned *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška. Vypočítá se spotřeba *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* potřebného ke zmýdelnění.

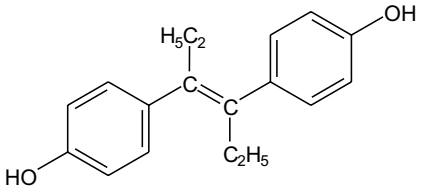
1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* odpovídá 55,56 mg $C_{12}H_{14}O_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Diethylstilbestrolum

Diethylstilbestrol



$C_{18}H_{20}O_2$ M_r 268,35 CAS 56-53-1

Je to (*E*)-α,β-diethyl-4,4′-stilbendiol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{20}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 172 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Roztok, získaný ve zkoušce Stanovení obsahu, po ozáření měřený při 230 nm až 450 nm *(2.2.25)* vykazuje dvě absorpční maxima; při 292 nm a při 418 nm.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *diethylstilbestrolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Mono- a dimethylethery, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 0,5 mg se rozpustí v 0,2 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 1 ml *kyseliny fosforečné R* a 3 min se zahřívá na vodní lázni; vznikne tmavě žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

4,4′-Dihydroxystilben a příbuzné ethery. 0,100 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 325 nm je nejvýše 0,50.

Mono- a dimethylethery. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *diethylstilbestrolu CRL* se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*.

Porovnávací roztok (b). 5 mg *diethylstilbestrolmonomethyletheru CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *diethylstilbestroldimethyletheru CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *dienestrolu CRL* se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min při 120 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) skvrny odpovídající diethylstilbestrolmonomethyletheru a diethylstilbestroldimethyletheru nejsou intenzivnější než odpovídající skvrny na chromatogramech porovnávacích roztoků (b) a (c) (0,5 %). Diethylstilbestrol vykazuje na chromatogramu jednu nebo někdy dvě skvrny. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny nejméně dvě přibližně stejně intenzivní od sebe oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

20,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 25,0 ml roztoku, který obsahuje 1 g *hydrogenfosforečnanu draselného R* v 55 ml *vody R*. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 20,0 mg *diethylstilbestrolu CRL*.

Do křemenných kyvet o tloušťce vrstvy 1 cm se odděleně vpraví stejné objemy zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku, kyvety se uzavřou a ozařují se ze vzdálenosti asi 5 cm krátkovlnnou rtuťovou nízkotlakovou lampou 2 W až 20 W po dobu asi 5 min. Měří se absorbance *(2.2.25)* ozářených roztoků v maximu při 418 nm proti *vodě R* jako kontrolní tekutině. V ozařování se pokračuje po dobu 3 min až 15 min podle příkonu lampy až do dosažení maxima absorbance při 418 nm (asi 0,7). Je-li třeba, mění se geometrie ozařování tak, aby se dosáhlo maximální a reprodukovatelné absorbance při 418 nm.

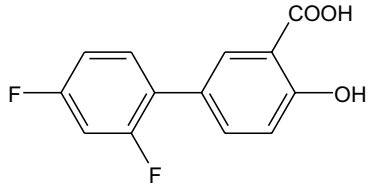
Obsah $C_{18}H_{20}O_2$ se vypočítá za použití zjištěných hodnot absorbancí zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a jejich koncentrací.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Diflunisalum

Diflunisal



$C_{13}H_8F_2O_3$ M_r 250,20 CAS 22494-42-4

Je to kyselina 2′,4′-difluor-4-hydroxybifenyl-3-karboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_8F_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,3% *(V/V)* v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 251 nm a 315 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 251 nm k absorbanci naměřené v maximu při 315 nm je 4,2 až 4,6.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *diflunisalu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *lihu 96% R*, odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Asi 2 mg se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne fialově červené zbarvení.

D. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do vzniku téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se ochladit, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do odbarvení roztoku a zfiltruje se. 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanoxidu zirkoničitého RS,* promíchá se a nechá 5 min stát. Zbarvení tohoto roztoku se porovná s kontrolním roztokem získaným za stejných podmínek při slepé zkoušce; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *4-bifenylolu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *4-bifenylolu R* se rozpustí v *methanolu R,* přidá se 1 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R* a *dichlormethanu R* (10 + 20 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,15 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v porovnávacím roztoku a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 55,0 mg *fluoranthenu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, methanolu R, vody R* a *acetonitrilu R* (2 + 25 + 55 + 70), průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu nebyla menší než 10 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času fluoranthenu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, s retenčním časem větším, než má pík fluoranthenu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,11 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Použije se platinový kelímek. Porovnávací roztok se připraví za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,3 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 700 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky v platinovém kelímku.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 40 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *vody R* a 0,2 ml *červeně fenolové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení roztoku na červenofialové.
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,02 mg $C_{13}H_8F_2O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. bifenyl-4-ol,

B. 2′,4′-difluorbifenyl-4-ol,

C. 2′,4′-difluorbifenyl-4-yl-acetat,

D. kondenzační produkty.

† Digitalis purpureae folium

List náprstníku červeného

Synonymum. Folium digitalis purpureae

Je to usušený list druhu *Digitalis purpurea* L. Obsahuje nejméně 0,3 % kardenolidů, počítáno jako digitoxin ($C_{41}H_{64}O_{13}$; M_r 765), vztaženo na drogu vysušenou při 100 °C až 105 °C.

Vlastnosti

Droga nevýrazného, ale charakteristického pachu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Celý list asi 10 cm až 40 cm dlouhý a 4 cm až 15 cm široký. Čepel vejčitě kopinatá až široce vejčitá. Křídlatý řapík je dlouhý jako třetina délky čepele. List je křehký, často rozdrcený. Na svrchní straně zelený, na spodní straně šedozelený. Na konci zašpičatělý; okraj nepravidelně vroubkovaný, zubatý nebo pilovitý, na bázi sbíhavý. Žilnatina zpeřená, postranní žilky vyniklé zvláště na spodní straně listu. Postranní žilky svírají s hlavní žilkou úhel asi 45° a anastomozují na okraji čepele, v dolní části sbíhají do řapíku. Listy na svrchní straně svraštělé, chlupaté, na spodní straně s vyniklou síťovitou žilnatinou, hustě chlupaté.

B. Droga se upráškuje (355). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: buňky pokožky s antiklinálními stěnami rovnými nebo vlnitě zprohýbanými, na spodní straně silně vlnitě zprohýbanými; kutikula hladká. Chlupy dvou typů; krycí chlupy tříbuněčné až pětibuněčné, jednořadé, tupě zakončené, s jednou nebo více kolabovanými buňkami, stěny buněk jemně bradavčité nebo jemně rýhované; žláznaté chlupy s jednobuněčnou, občas s vícebuněčnou jednořadou nohou a jednobuněčnou až dvoubuněčnou, výjimečně až čtyřbuněčnou hlavičkou. Anomocytické průduchy (*2.8.3*) na svrchní straně ojedinělé nebo zcela chybí, na spodní straně četné. Krystaly šťavelanu vápenatého a sklerenchymatické pletivo chybí.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (180) se vaří 2 min s 20 ml *lihu R* 50% (*V/V*) a 10 ml *octanu olovnatého RS*. Po ochlazení se odstřeďuje. Horní čirá vrstva se protřepává dvakrát s 15 ml *chloroformu R;* je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R;* zfiltruje se. 10 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R*.
Porovnávací roztok. 5 mg *purpureaglykosidu A CRL*, 2 mg *purpureaglykosidu B CRL*, 5 mg *digitoxinu R* a 2 mg *gitoxinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (7,5 + 10 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se směsí objemových dílů roztoku *chloraminu T R* (10 g/l) a roztoku *kyseliny trichloroctové R* (250 g/l) v *lihu 96% R* (2 + 8). Suší se 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části patrna světle modře fluoreskující skvrna purpureaglykosidu B, těsně nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna purpureaglykosidu A, ve střední části chromatogramu světle modře fluoreskující skvrna gitoxinu a nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna digitoxinu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další fluoreskující skvrny.

D. 5 ml roztoku ze Zkoušky totožnosti C se odpaří na vodní lázni do sucha. K odparku se přidají 2 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS;* do 5 min vzniká červenofialové zbarvení.

E. 5 ml roztoku ze Zkoušky totožnosti C se odpaří na vodní lázni do sucha. K odparku se přidají 3 ml *xanthydrolu RS* a zahřívá se 3 min na vodní lázni; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejsou přítomny listy lysé nebo jen roztroušeně chlupaté, při pohledu svrchu s pokožkovými buňkami s tečkovanými antiklinálními stěnami (*Digitalis lanata*).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 6,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 5,0 %.

Stanovení obsahu

0,250 g práškované drogy (180) se protřepává 1 h s 50,0 ml *vody R*. Pak se přidá 5,0 ml roztoku *octanu olovnatého R* (150 g/l), protřepe se a po několika minutách se přidá 7,5 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (40 g/l), zfiltruje se skládaným filtrem. 50,0 ml filtrátu se vaří 1 h pod zpětným chladičem s 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* (150 g/l HCl). Roztok se převede do dělicí nálevky; baňka se promyje dvakrát 5 ml *vody R;* spojené tekutiny se protřepávají třikrát 25 ml *chloroformu R*. Spojené dolní vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a roztok se zředí *chloroformem R* na 100,0 ml. 40,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 7 ml *lihu R* 50% (*V/V*), přidají se 2 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *digitoxinu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. K 5,0 ml roztoku se přidá 25 ml *vody R* a 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* (150 g/l HCl). Vaří se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni; dále se postupuje způsobem výše uvedeným. Absorbance (*2.2.25*) se měří při 540 nm několikrát v průběhu 12 min tak, aby bylo dosaženo maxima. Jako kontrolní tekutina se použije směs 7 ml *lihu R* 50% (*V/V*), 2 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*.

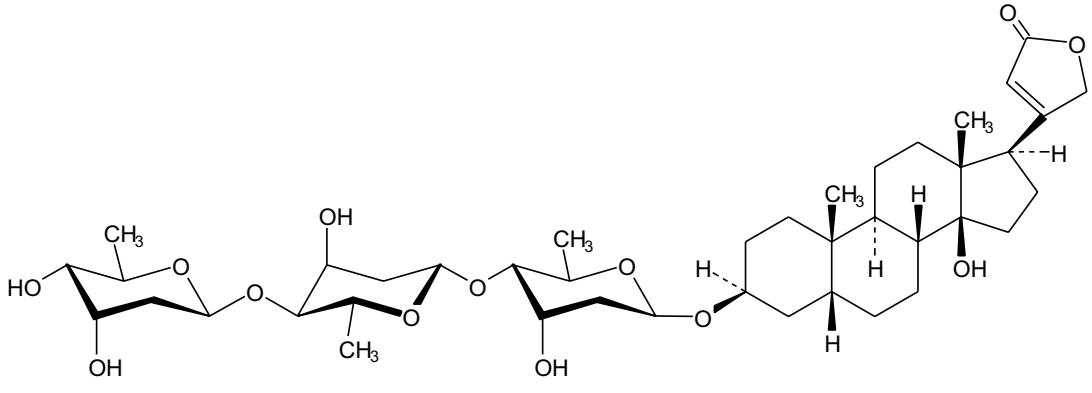
Z naměřených hodnot absorbance a koncentrací roztoků se vypočítá obsah kardenolidů v procentech, počítáno jako digitoxin ($C_{41}H_{64}O_{13}$).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.
Separandum.

†† Digitoxinum

Digitoxin



$C_{41}H_{64}O_{13}$ M_r 764,95 CAS 71-63-6

Je to 3β-[(O-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl-(1→4)-O-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl)oxy]-14-hydroxy-5β,14β-kard-20(22)-enolid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{41}H_{64}O_{13}$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve směsi stejných objemových dílů chloroformu a methanolu, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *digitoxinu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 0,5 mg se suspenduje v 0,2 ml lihu 60% *(V/V)*. Přidá se 0,1 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vzniká fialové zbarvení.

D. Asi 0,5 mg se rozpustí opatrným zahřátím v 1 ml *kyseliny octové ledové R*, nechá se ochladit a přidá se 0,05 ml *chloridu železitého RS1*. Na tento roztok se opatrně navrství 1 ml *kyseliny sírové R* tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev, a nechá se stát. Na styku obou tekutin vznikne hnědý prstenec, který stáním přechází na zelené a pak na modré zbarvení, která prolínají do horní vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 50 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda I)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +16,0° až +18,5°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,25 g v *chloroformu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 2 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *digitoxinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 2 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *gitoxinu CRL* se mícháním rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* na 2 ml.
Porovnávací roztok (e). 1 ml porovnávacího roztoku (a) a 1 ml porovnávacího roztoku (c) se smíchají.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a ihned se vyvíjí směsí objemových dílů *methanolu R*, *cyklohexanu R* a *chloroformu R* (15 + 40 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min v proudu studeného vzduchu a vyvíjení se opakuje. Vrstva se 5 min suší v proudu studeného vzduchu, postříká se směsí objemových dílů *kyseliny sírové R* a *lihu 96% R* (1 + 9), 15 min se zahřívá při 130 °C a pozoruje se v denním světle.

Gitoxin. Skvrna odpovídající gitoxinu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,0 %).

Jiné glykosidy. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající gitoxinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou patrny zřetelně oddělené skvrny odpovídající digitoxinu, gitoxinu a jiným glykosidům a skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je zřetelně viditelná.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,5 %; 0,500 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným ve zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

40,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Současně za stejných podmínek se připraví porovnávací roztok za použití 40,0 mg *digitoxinu CRL*. K 5,0 ml obou roztoků se přidají 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS* a nechá se 30 min stát za chránění před světlem. Měří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 495 nm proti současně připravenému kontrolnímu roztoku, kterým je směs 5,0 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS*.

Obsah $C_{41}H_{64}O_{13}$ se vypočítá ze zjištěných absorbancí a koncentrací roztoků.

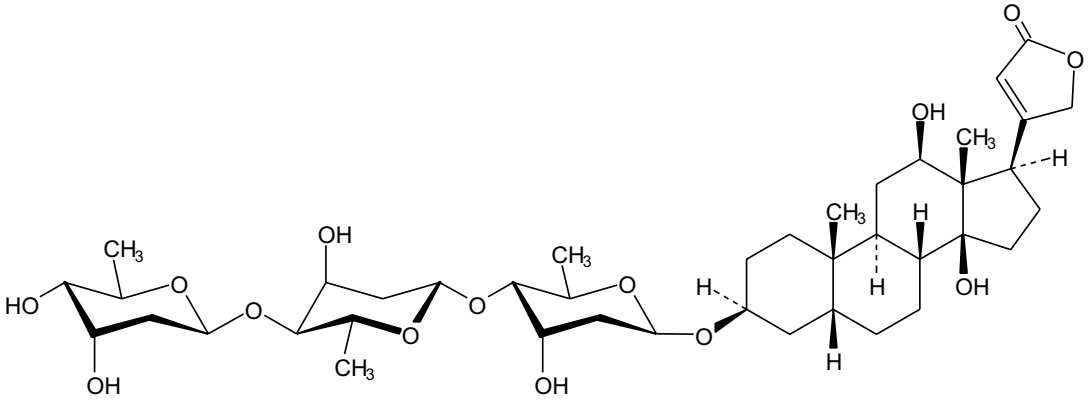
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 15 °C.

Venenum.

†† Digoxinum

Digoxin



$C_{41}H_{64}O_{14}$ M_r 780,95 CAS 20830-75-5

Je to 3β-[(O-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl-(1→4)-0-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl--(1→4)-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl)oxy]-12β,14-dihydroxy-5β,14β-kard-20(22)-enolid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{41}H_{64}O_{14}$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve směsi stejných objemových dílů dichlormethanu a methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *digoxinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 0,5 mg se suspenduje v 0,2 ml *lihu R* 60% *(V/V)*. Přidá se 0,1 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vzniká fialové zbarvení.

D. Asi 0,5 mg se rozpustí opatrným zahřátím v 1 ml *kyseliny octové ledové R*, nechá se ochladit a přidá se 0,05 ml *chloridu železitého RS1*. Na tento roztok se opatrně navrství 1 ml *kyseliny sírové R* tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev, a nechá se stát. Na styku obou tekutin vznikne hnědý prstenec, který stáním přechází na zelené a pak na modré zbarvení, která prolínají do horní vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 50 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda I)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +10,0° až +13,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,20 g v *pyridinu bezvodém R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *křemeliny G R*. Deska se impregnuje v uzavřené chromatografické komoře potřebným množstvím směsi objemových dílů *formamidu R* a *acetonu R* (10 + 90) tak, aby deska byla ponořena asi 5 mm v tekutině. Když je impregnační směs nejméně 15 cm od spodní hrany desky, deska se vyjme a nechá se volně na vzduchu 30 min vytěkat. Deska se ihned použije.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *digoxinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 2 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* na 4 ml.
Porovnávací roztok (d). 5 mg *digitoxinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (e). 5 mg *gitoxinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *formamidu R*, *2-butanonu R* a *xylenu R* (4 + 50 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se suší v proudu studeného vzduchu tak, aby spodní hrana desky byla ještě viditelně vlhká, a vyvíjení se opakuje. Vrstva se 20 min suší při 115 °C, nechá se ochladit a postříká se směsí objemových dílů čerstvě připraveného roztoku *chloraminu T R* (30 g/l) a roztoku *kyseliny trichloroctové R* (250 g/l) v *lihu 96% R* (1 + 15), 5 min se zahřívá při 115 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna odpovídající digitoxinu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %); skvrna odpovídající gitoxinu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (2,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající digitoxinu a gitoxinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je větší než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným ve zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

40,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R*, je-li třeba zahřátím, a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Současně za stejných podmínek se připraví porovnávací roztok za použití 40,0 mg *digoxinu CRL*. K 5,0 ml každého roztoku se přidají 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS* a nechá se 30 min stát za chránění před světlem. Měří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 495 nm proti současně připravenému kontrolnímu roztoku, kterým je směs 5,0 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS*.

Obsah $C_{41}H_{64}O_{14}$ se vypočítá ze zjištěných absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

Nečistoty

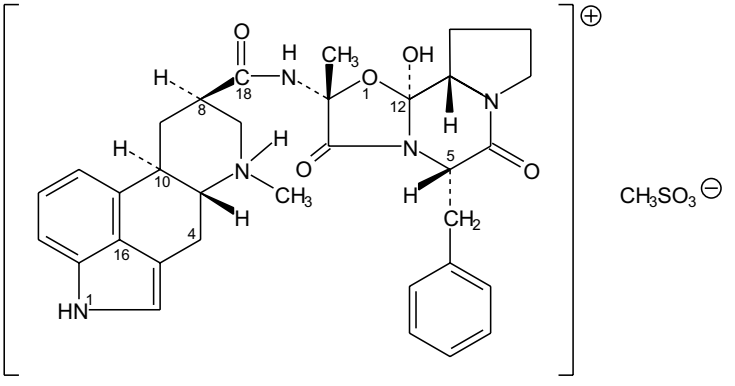
A. digitoxin,

B. gitoxin.

†† Dihydroergotamini mesilas

Dihydroergotaminiummesilat

Synonyma. Dihydroergotaminium mesylicum, mesylan dihydroergotaminia



$C_{34}H_{41}N_5O_8S$ M_r 679,79 CAS 6190-39-2

Je to dihydroergotaminiummethansulfonat, tj. (5′*S*,10*R*)-5′-benzyl-9,10-dihydro-12′-hydroxy--2′-methyl-3′, 6′,18-ergotamantrion-methansulfonat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{34}H_{41}N_5O_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, mírně rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 5,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 250 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 281 nm a 291 nm, a prodlevu při 275 nm. Nad 320 nm je absorbance zanedbatelná. Specifická absorbance v maximu při 281 nm je 95 až 105, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dihydroergotaminiummesilatu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 g se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a třepe se asi 5 min. Zfiltruje se a přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1;* filtrát zůstává čirý. 0,1 g se smíchá s 0,4 g upráškovaného *hydroxidu sodného R*, zahřívá se do roztavení a potom ještě 1 min. Tavenina se po ochlazení vylouží 5 ml *vody R*, povaří se a výluh se zfiltruje. Filtrát se okyselí přidáním *kyseliny chlorovodíkové RS1* a znovu zfiltruje. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,10 g se rozpustí ve směsi 0,1 ml roztoku *kyseliny methansulfonové R* (70 g/l) a 50 ml *vody R;* roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ nebo $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,4 až 5,4; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,10 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -42° až -47°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *pyridinu bezvodém R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu G R. Porovnávací roztoky a zkoušené roztoky se připraví bezprostředně před nanášením v následujícím pořadí.*

Porovnávací roztok (a). 20 mg *dihydroergotaminiummesilatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 5 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se za chránění před světlem směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *ethylacetatu R* a *dichlormethanu R* (1 + 6 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se suší nejvýše 1 min v proudu studeného vzduchu a vyvíjení se opakuje za chránění před světlem v čerstvě připravené stejné vyvíjecí směsi po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a dostatečně se postříká *dimethylaminobenzaldehydem RS7* a suší se 2 min v proudu teplého vzduchu.

Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 4,0 %; 0,5000 g se suší 5 h při 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,1 kPa.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a zředí se roztokem *kyseliny vinné R* (10 g/l) na 200,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny vinné R* (10 g/l) na 50,0 ml. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 50,0 mg *dihydroergotaminiummesilatu CRL*. Ke 3,0 ml každého roztoku se pomalu a za opatrného míchání přidá 6,0 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS6.* Roztoky se nechají stát za chránění před světlem a přesně po 30 min se změří absorbance *(2.2.25)* každého roztoku v maximu při 585 nm proti kontrolnímu roztoku, kterým je současně připravená směs 3,0 ml roztoku *kyseliny vinné R* (10 g/l) a 6,0 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS6*.

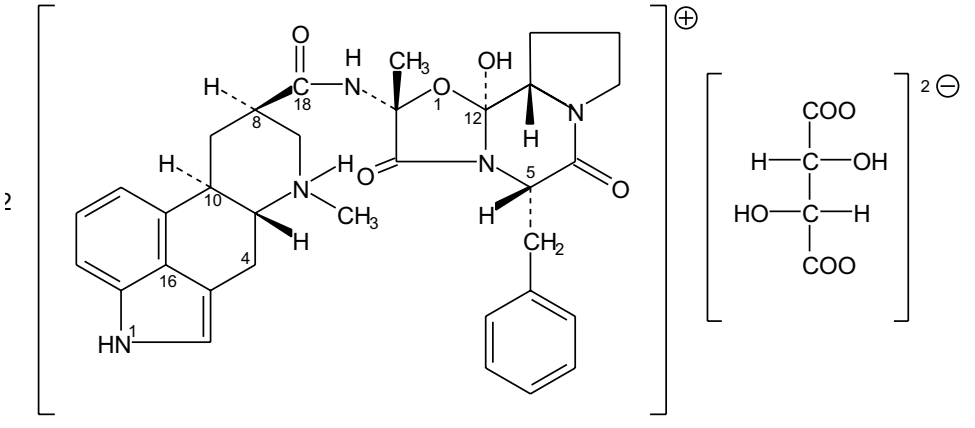
Obsah $C_{34}H_{41}N_5O_8S$ se vypočítá z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

† Dihydroergotamini tartras

Dihydroergotaminiumtartarat



$C_{70}H_{80}N_{10}O_{16}$ M_r 1317,46 CAS 5989-77-5

Je to (5′*S*,10*R*)-5′-benzyl-9,10-dihydro-12′-hydroxy-2′-methyl-3′,6′,18-ergotamantrion-(2*R*,3*R*)--tartarat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{70}H_{80}N_{10}O_{16}$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 5,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 250 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 281 nm a 291 nm, a prodlevu při 275 nm. Nad 320 nm je absorbance zanedbatelná. Specifická absorbance v maximu při 281 nm je 95 až 115, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dihydroergotaminiumtartaratu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 15 mg se suspenduje v 1 ml *vody R*. 0,1 ml suspenze vyhovuje zkoušce (b) na vínany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v *lihu R* 85% (*V/V*) opatrným zahřátím ve vodní lázni při 40 °C a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok $Ž_7$ nebo $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,5; 50 mg se suspenduje v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R,* 10 min se třepe a nechá se stát. Měří se čirá supernatantní tekutina.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -52° až -57°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *pyridinu bezvodém R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Porovnávací roztoky a zkoušené roztoky se připraví bezprostředně před nanášením v následujícím pořadí.*

Porovnávací roztok (a). 20 mg *dihydroergotaminiumtartaratu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 5 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se za chránění před světlem směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *ethylacetatu R* a *dichlormethanu R* (1 + 6 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se suší nejvýše 1 min v proudu studeného vzduchu a vyvíjení se opakuje za chránění před světlem v čerstvě připravené stejné vyvíjecí směsi po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a dostatečně se postříká *dimethylaminobenzaldehydem RS7* a suší se 2 min v proudu teplého vzduchu.

Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; suší se 0,200 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a zředí se roztokem *kyseliny vinné R* (10 g/l) na 200,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny vinné R* (10 g/l) na 50,0 ml. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 50,0 mg *dihydroergotaminiumtartaratu CRL*. Ke 3,0 ml každého roztoku se pomalu a za opatrného míchání přidá 6,0 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS6.* Roztoky se nechají stát chráněny před světlem a přesně po 30 min se změří absorbance *(2.2.25)* každého roztoku v maximu při 585 nm proti kontrolnímu roztoku, kterým je současně připravená směs 3,0 ml roztoku *kyseliny vinné R* (10 g/l) a 6,0 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS6*.

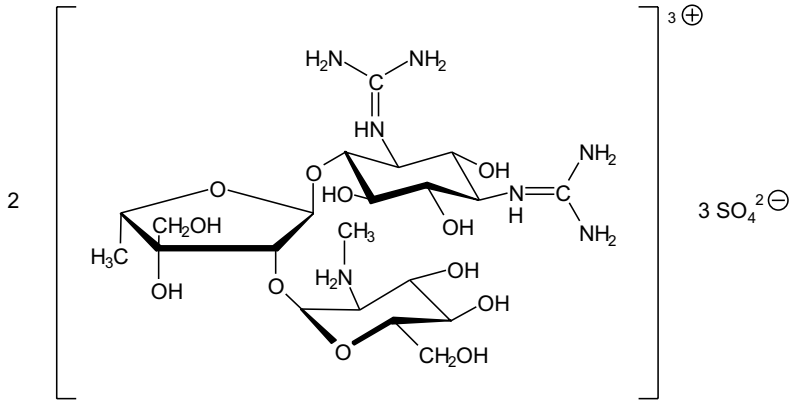
Obsah $C_{70}H_{80}N_{10}O_{16}$ se vypočítá z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Dihydrostreptomycini sulfas

Dihydrostreptomyciniumsulfat



$C_{42}H_{88}N_{14}O_{36}S_3$ M_r 1461,41 CAS 5490-27-7

Je to bis{N,N'-diamidinio-4-O-[5-deoxy-2-O-(2-deoxy-2-methyl-amonio-α-L-glukopyranosyl)-3--C-hydroxymethyl-α-L-*lyxo*-furanosyl]-D-streptamonium}trisulfat. Dihydrostreptomyciniumsulfat se získává katalytickou hydrogenací streptomycinu nebo jiným způsobem. Mohou se přidávat stabilizátory. Účinnost je nejméně 730 m.j. v 1 miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Výroba

Výrobní postup je validován, aby se prokázalo, že pokud bude látka zkoušena, vyhoví následující zkoušce:

Neškodnost (*2.6.9*). Každé myši se vstříkne 1 mg rozpuštěný v 0,5 ml *vody na injekci R*.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v acetonu, v lihu 96% a v methanolu. Látka může být hygroskopická.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy o síle 0,75 mm připravené z následující směsi: 0,3 g *karbomeru R* se smíchá s 240 ml *vody R* a nechá se stát 1 h za mírného protřepávání; postupným přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS* za stálého

protřepávání se upraví na pH 7 a přidá se 30 g *silikagelu H R*. Deska s vrstvou se 1 h zahřívá při 110 °C, nechá se vychladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *dihydrostreptomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *dihydrostreptomyciniumsulfatu CRL*, 10 mg *kanamyciniummonosulfatu CRL* a 10 mg *neomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se roztokem *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (70 g/l) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se směsí stejných objemů roztoku *dihydroxynaftalenu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *kyseliny sírové R* (460 g/l). Zahřívá se 5 min až 10 min na 150 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny tři zřetelně oddělené skvrny.

B. 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 1 ml *alfa-naftolu RS* a 2 ml směsi stejných objemových dílů *chlornanu sodného RS* a *vody R;* vzniká červené zbarvení.

C. 10 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Zahřívá se 2 min na vodní lázni. Přidají se 2 ml roztoku *alfa-naftolu R* (5 g/l) v *roztoku hydroxidu sodného 1 mol/l R* a zahřívá se 1 min na vodní lázni; vznikne fialově-růžové zabarvení.

D. Vyhovuje zkoušce na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než stupeň 5 ve stupnici porovnávacích roztoků nejvhodnější barvy (*Metoda II, 2.2.2*). Nechá se 24 h stát chráněn před světlem, při teplotě asi 20 °C. Roztok S neopalizuje více než porovnávací suspenze II (*2.2.1*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -83° až -91°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,200 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 10,0 ml

Methanol. Nejvýše 0,2 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 8,0 mg *methanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m až 2,0 m a vnitřního průměru 2 mm až 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při konstantní průtokové rychlosti 30 ml/min až 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Kolona se udržuje při konstantní teplotě mezi 120 °C až 140 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je nejméně o 50 °C vyšší než teplota kolony. Plocha píku odpovídajícího methanolu na chromatogramu zkoušeného roztoku není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Streptomycin. Nejvýše 1 %; 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml. Přidá se 5,0 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zahřívá přesně 10 min na vodní lázni. Roztok se chladí přesně 5 min v ledu, přidají se 3 ml roztoku *síranu železito-amonného R* (15 g/l) v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS*, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a promíchá se (zkoušený roztok). Současně a stejným způsobem se připraví porovnávací roztok s 10 mg *streptomycinimsulfatu CRL* v 50 ml *vody R*. S 5,0 ml tohoto roztoku se dále postupuje jako při přípravě zkoušeného roztoku. Přesně za 20 min po přidání roztoku síranu železito-amonného se měří absorbance (*2.2.25*) obou roztoků v maximu při 525 nm ve 2cm vrstvě proti kontrolnímu roztoku připravenému stejným způsobem bez přidání zkoušené látky. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (1 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se 4 h se suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřekračujícím 0,1 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Sírany. 18,0 % až 21,5 %, počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a pH roztoku se upraví *amoniakem 26% R* na hodnotu 11. Přidá se 10,0 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *červeni ftaleinové R*. Titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS;* když se barva roztoku začíná měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud fialově modré zbarvení nezmizí.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,50 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

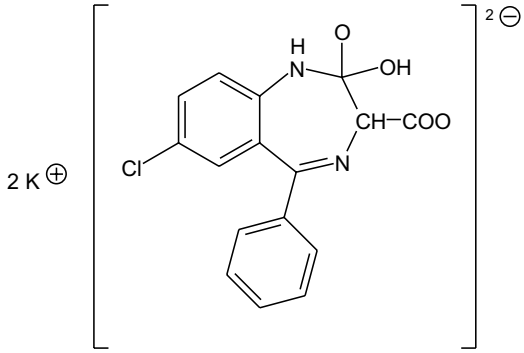
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda látka:
- obsahuje stabilizátor, jeho název a množství,
- je sterilní,
- je prostá bakteriálních endotoxinů.

§ Dikalii clorazepas

Didraselná sůl klorazepatu



$C_{16}H_{11}ClK_2N_2O_4$ M_r 408,92 CAS 57109-90-7

Je to didraselná sůl kyseliny (*RS*)-7-chlor-2,3-dihydro-2-hydroxy-2-oxido-5-fenyl-1*H*-1,4-benzodiazepin-3-karboxylové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{11}ClK_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je snadno nebo velmi snadno rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v dichlormethanu. Roztoky ve vodě a v lihu 96% jsou nestabilní a připravují se v čas potřeby.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v roztoku *uhličitanu draselného R* (0,3 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml (roztok A). Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku A při 280 nm až 350 nm; roztok vykazuje široké absorpční maximum při asi 315 nm. Hodnota specifické absorbance v maximu je 49 až 56. 10,0 ml roztoku A se zředí roztokem *uhličitanu draselného R* (0,3 g/l) na 100,0 ml (roztok B). Měří se absorbance roztoku B při 220 nm až 280 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 230 nm. Hodnota specifické absorbance v maximu je 800 až 870.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *didraselné soli klorazepatu CRL.*

C. Asi 20 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm; roztok vykazuje žlutou fluorescenci.

D. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *modři thymolové RS;* roztok se zbarví fialově modře.

E. 1,0 g se umístí do kelímku, přidají se 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se nejprve na vodní lázni, pak se žíhá, dokud všechny černé částečky nezmizí. Po ochlazení se zbytek rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml; roztok vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rychle za míchání rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Tento roztok hodnocený bezprostředně po přípravě je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $ZŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R. Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v roztoku *uhličitanu draselného R* (40 g/l) a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *aminochlorbenzofenonu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 25 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *nordazepamu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 50 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 25 ml.

Porovnávací roztok (c). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí roztokem *uhličitanu draselného R* (40 g/l) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *chloroformu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající nordazepamu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající nordazepamu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *dusitanu sodného R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS,* usuší se v proudu teplého vzduchu a postříká se roztokem *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (4 g/l) v *lihu 96% R.* Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídající aminochlorbenzofenonu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,2 %; 1,000 g se 4 h suší ve vakuu při 60 °C.

Stanovení obsahu

0,130 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 30 ml *dichlormethanu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* dvou inflexních bodů. Poměr objemu kyseliny chloristé spotřebované do druhého inflexního bodu k objemu kyseliny chloristé spotřebované do prvního inflexního bodu je 1,48 až 1,52. K výpočtu obsahu se použije spotřeba kyseliny chloristé zjištěná ve druhém inflexním bodu.

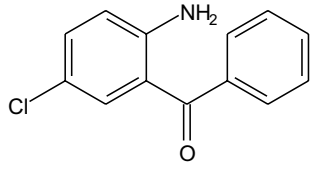
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,63 mg $C_{16}H_{11}ClK_2N_2O_4$.

Uchovávání

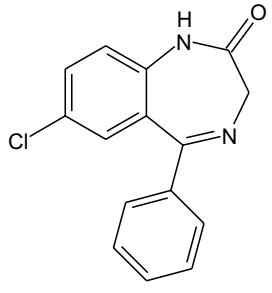
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

Nečistoty



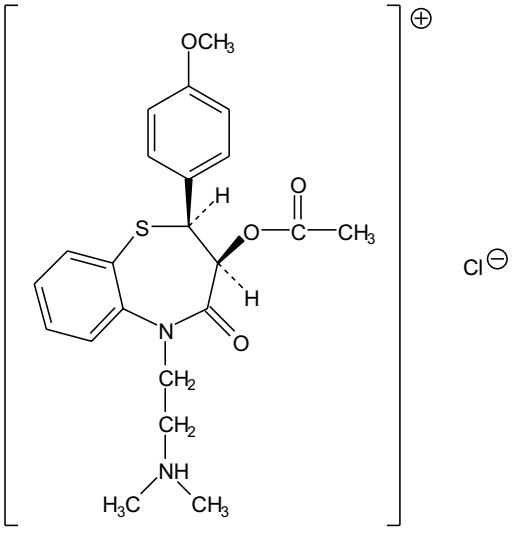
A. 2-amino-5-chlorbenzofenon,



B. nordazepam.

† Diltiazemi hydrochloridum

Diltiazemiumchlorid



$C_{22}H_{27}ClN_2O_4S$ M_r 450,98 CAS 33286-22-5

Je to (2*S*,3*S*)-1-{5-[3-acetoxy-2,3-dihydro-2-(4-methoxyfenyl)-4-oxo]-1,5-benzothiazepin-(5*H*)-yl}ethyldimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{27}ClN_2O_4S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, v methanolu a v dichlormethanu, těžce rozpustný v ethanolu.

Taje při asi 213 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *diltiazemiumchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,10 g *diltiazemiumchloridu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové R*, *vody R*, *dichlormethanu R* a *ethanolu R* (1 + 3 + 10 + 12) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 1 ml *Reineckovy soli RS;* vznikne růžová sraženina.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)* 4,3 až 5,3; měří se roztok připravený zředěním 2,0 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10,0 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +115° až +120°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený zředěním 5,0 ml roztoku S *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *diltiazemiumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 3 mg *diltiazemu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 1,2 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,3 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *ethanolu R*, *acetonitrilu R* a roztoku obsahujícího v 1 litru 6,8 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 0,1 ml *N,N-dimethyloktylaminu R* (5 + 25 + 70), jejíž pH bylo upraveno na 4,5 pomocí *kyseliny fosforečné zředěné RS*, s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 240 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 20 µl každého roztoku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) nebyla menší než 10 % celé stupnice zapisovače. Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 5násobku retenčního času hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píky diltiazemu nečistoty A a diltiazemu je nejméně 4,0 a symetrie píků není větší než 2,0. Jestliže je třeba, upraví se koncentrace N,N-dimethyloktylaminu v mobilní fázi. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,3 %). K píkům s plochou menší, než je 0,025násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c), se nepřihlíží.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20,0 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a 60 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 45,1 mg $C_{22}H_{27}ClN_2O_4S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. (2*R*,3*S*)-3-acetyloxy-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-2-(4-methoxy-fenyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-on,

B. (2*S*,3*S*)-3-acetyloxy-2-(4-methoxyfenyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-on,

C. (2*S*,3*S*)-3-acetyloxy-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-on,

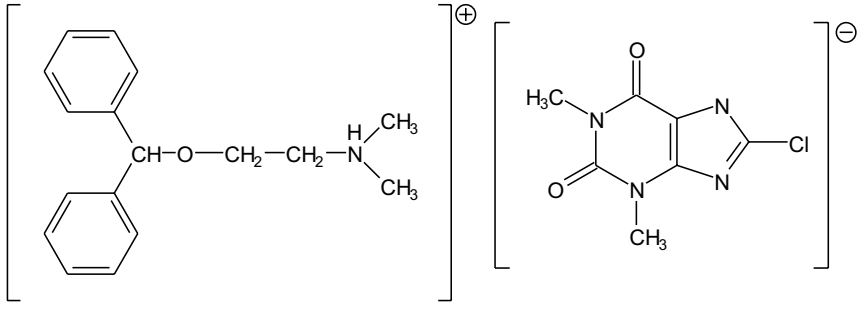
D. (2*S*,3*S*)-3-acetyloxy-2-(4-methoxyfenyl)-5-[2-(methylamino)-ethyl]-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-on,

E. (2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2-(4-methoxyfenyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-on,

F. (2*S*,3*S*)-5-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-hydroxy-2-(4-methoxyfenyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5*H*)-on.

† Dimenhydrinatum

Dimenhydrinat



$C_{24}H_{28}ClN_5O_3$ M_r 469,97 CAS 523-87-5

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 53,0 % až 55,5 % difenylhydraminu (2-benzhydryloxyethyl-N,N-dimethylamin; $C_{17}H_{21}NO$; M_r 255,36) a 44,0 % až 46,5 % 8-chlortheofylinu (8-chlor-1,3--dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion; $C_7H_7ClN_4O_2$; M_r 214,61).

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 102 °C až 106 °C.

B. 0,1 g se rozpustí ve směsi 3 ml *vody R* a 3 ml *lihu 96% R*, přidá se 6 ml *vody R*, 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a směs se chladí 30 min ve vodě s ledem. Třením stěn kádinky skleněnou tyčinkou, je-li to třeba, se vyvolá krystalizace. Asi 10 mg sraženiny se v porcelánové misce rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, přidá se 0,1 g *chlorečnanu draselného R* a odpaří se do sucha. Působením par amoniaku se načervenalý odparek zbarví fialově červeně.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dimenhydrinatu CRL*.

D. 0,2 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 10 ml *trinitrofenolu RS*. Třením stěn kádinky skleněnou tyčinkou se vylučuje sraženina, která po promytí *vodou R* a vysušení při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 130 °C až 134 °C.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,1 až 7,6; měří se roztok připravený třepáním 0,4 g s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* po dobu 2 min a zfiltrováním.

Theofylin a látky příbuzné difenhydraminu. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,40 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *theofylinu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 100 ml.

Na tenkou vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není skvrna odpovídající theofylinu intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným RS,* nechá se usušit na vzduchu a postříká se *peroxidem vodíku zředěným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrnám o R_F asi 0,1 a méně.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,5 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 25 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní roztok olova (2 μg Pb/ml) získaný zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Difenhydramin. 0,200 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,54 mg $C_{17}H_{21}NO$.

8-Chlortheofylin. K 0,800 g se přidá 50 ml *vody R*, 3 ml *amoniaku zředěného RS1* a 0,6 g *dusičnanu amonného R* a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Přidá se 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a za míchání se na vodní lázni zahřívá ještě 15 min. Po ochlazení se přidá 25 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Zfiltruje se, prvních 25 ml filtrátu se odstraní a dalších 100,0 ml se po přidání 5 ml *síranu amonno-železitého RS2* titruje *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku žlutohnědého zbarvení.

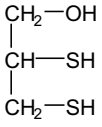
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,46 mg $C_7H_7ClN_4O_2$.

Uchovávání

Separandum.

† Dimercaprolum

Dimerkaprol



$C_3H_8OS_2$ M_r 124,22 CAS 59-52-9

Je to (*R*,*S*)-2,3-dimerkapto-1-propanol. Obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_3H_8OS_2$.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě žlutá tekutina. Je dobře rozpustný ve vodě a v podzemnicovém oleji, je mísitelný s lihem 96% a s benzylbenzoatem.

Zkoušky totožnosti

A. 0,05 ml se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 1 ml *jodu 0,05 mol/l RS;* barva jodu okamžitě zmizí.

B. 0,1 ml se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidají se 2 ml *síranu měďnatého RS;* vznikne modročerná sraženina, která se rychle mění na tmavě šedou.

C. Ve zkumavce se zabroušenou zátkou se suspenduje 0,6 g *bismutičnanu sodného R* předem 2 h zahřívaného při 200 °C ve směsi 2,8 ml *kyseliny fosforečné zředěné RS* a 6 ml *vody R*. Přidá se 0,2 ml zkoušené látky, promíchá se a nechá se 10 min stát za častého protřepávání. K 1 ml supernatantní tekutiny se přidá 5 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (4 g/l) v *kyselině sírové R* a promíchá se. 15 min se zahřívá ve vodní lázni; vzniká fialově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarvena než porovnávací barevný roztok H_6 nebo $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,2 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,25 ml *zeleně bromkresolové RS* a 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidáním nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na modré.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,568 až 1,574.

Halogenidy. K 2,0 g se přidá 25 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Líh se odpaří v proudu horkého vzduchu, přidá se 20 ml *vody R* a ochladí se. Přidá se 40 ml *vody R* a 10 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a opatrně se 10 min vaří, ochladí se a rychle se zfiltruje. Přidá se 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 5,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru se titruje *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do červenavě žlutého zbarvení. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami odměrného roztoku není větší než 1,0 ml.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 40 ml *methanolu R*, přidá se 20 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, 50,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS*, nechá se 10 min stát a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 6,21 mg $C_3H_8OS_2$.

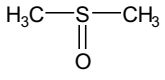
Uchovávání

Ve vzduchotěsných a zcela naplněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Separandum.

† Dimethylis sulfoxidum

Dimethylsulfoxid

Synonymum. Dimethylsulfoxidum



C_2H_6OS M_r 78,13 CAS 67-68-5

Je to sulfinylbismethan.

Vlastnosti

Bezbarvá kapalina nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, mísitelný s vodou, s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dimethylsulfoxidu CRL*.

D. 50 mg *chloridu nikelnatého R* se rozpustí v 5 ml zkoušené látky; roztok je zelenožlutý. Roztok se zahřeje ve vodní lázni na 50 °C; zbarvení roztoku se změní na zelené nebo modrozelené a po ochlazení opět na zelenožluté.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 50,0 g se rozpustí ve 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke vzniku růžového zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 5,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,100 až 1,104.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,478 až 1,479.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. Není nižší než 18,3 °C.

Absorbance *(2.2.25)*. Zkoušená látka se probublává 15 min *dusíkem R* a změří se její absorbance proti *vodě R* jako kontrolní tekutině při 270 nm až 350 nm. Zkoušená látka nevykazuje absorbanci vyšší než 0,30 při 275 nm, vyšší než 0,20 při 285 nm a 295 nm a nevykazuje žádné absorpční maximum.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *bibenzylu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,125 g *bibenzylu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 50 ml.
Zkoušený roztok (a). 5,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 g se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *acetonem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 50,0 mg zkoušené látky a 50 mg *dimethylsulfonu R* se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *acetonem R* na 100,0 ml.

Chromatografie se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R1* (125 μm až 136 μm) impregnovanou 10 % *makrogoladipatu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje při 165 °C, teplota vstřikovacího prostoru a detektoru při 190 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku a citlivost detektoru se nastaví tak, aby výšky tří píků, kromě píku rozpouštědla, nebyly menší než 70 % celé stupnice zapisovače. Látky se eluují v pořadí: dimethylsulfoxid, dimethylsulfon a bibenzyl.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku rozlišení mezi píky dimethylsulfoxidu a dimethylsulfonu je nejméně 3.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku (a). Ověří se, zda se na chromatogramu nevyskytují píky se stejným retenčním časem, jako má vnitřní standard.

Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku (b), 1 μl porovnávacího roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající čtyřnásobku retenčního času dimethylsulfoxidu, který je asi 5 min.

Za použití chromatogramu porovnávacího roztoku se vypočítá poměr (R) plochy píku dimethylsulfoxidu k ploše píku vnitřního standardu. Za použití chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se vypočítá poměr součtu ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku rozpouštědla a píku vnitřního standardu, k ploše píku vnitřního standardu; tento poměr není větší než R (0,1%).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 10,00 g zkoušené látky.

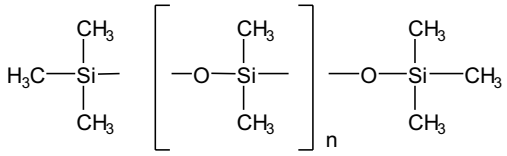
Uchovávání

Ve vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Dimeticonum

Dimetikon

Synonyma. Dimethylsiloxanum, silikonový olej



$(C_2H_6OSi)_n$ CAS 9006-65-9

Je to poly(dimethylsiloxan) získaný hydrolýzou a polykondenzací dichlordimethylsiloxanu a chlortrimethylsilanu. Existují různé druhy rozlišené číslem, které udává deklarovanou viskozitu a je uvedeno za názvem.

Jejich stupeň polymerizace (n = 20 až 400) odpovídá kinematickým viskozitám v rozmezí 20 $mm^2.s^{-1}$ až 1000 $mm^2.s^{-1}$ (20 až 1000 cSt).

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina o různé viskozitě. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v methanolu, mísitelný s etherem, s ethylacetatem, s butanonem a s toluenem, velmi těžce rozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti (kinematická viskozita při 25 °C).

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dimetikonu CRL*. Část spektra mezi 850 cm^{-1} až 750 cm^{-1} se nehodnotí, protože může vykazovat mírné odlišnosti závisející na stupni polymerizace.

C. 0,5 g se zahřívá ve zkumavce nad malým plamenem, dokud se nezačnou objevovat bílé páry. Zkumavka se převrátí nad druhou zkumavku obsahující 1 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (1 g/l) v *kyselině sírové R* tak, aby páry dosáhly roztoku. Druhá zkumavka se protřepává asi 10 s a zahřívá se 5 min na vodní lázni; roztok se zbarví fialově.

D. V platinovém kelímku se připraví síranový popel *(2.4.14)* za použití 50 mg zkoušené látky. Vzniklý bílý prášek vyhovuje zkoušce na křemičitany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. K 2,0 g se přidá 25 ml směsi stejných objemových dílů *ethanolu R* a *etheru R*. Přidá se 0,2 ml *modři bromthymolové RS1* a protřepe se. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Viskozita *(2.2.9)*. Stanoví se kinematická viskozita při 25 °C. Pro dimetikony s deklarovanou viskozitou větší než 50 $mm^2.s^{-1}$ se kinematická viskozita liší od deklarované hodnoty nejvýše o ±5 %. Pro dimetikony s deklarovanou viskozitou 50 $mm^2.s^{-1}$ nebo nižší se kinematická viskozita liší od deklarované hodnoty nejvýše o ±10 %.

Minerální oleje. 2 ml se pozorují ve zkumavce v ultrafialovém světle při 365 nm. Fluorescence není intenzivnější než fluorescence roztoku, který obsahuje 0,1 μg *chininiumsulfatu R* v 1 ml *kyseliny sírové 0,005 mol/l RS* a je pozorovaný za stejných podmínek.

Fenylované sloučeniny. 5,0 g se rozpustí za protřepávání v 10 ml *cyklohexanu R*. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 250 nm až 270 nm není větší než 0,2.

Těžké kovy. 1,0 g se smíchá s *chloroformem R* a zředí se jím na 20 ml. Přidá se 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *dithizonu R* (0,02 g/l) v *chloroformu R*, 0,5 ml *vody R* a 0,5 ml směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (2 g/l) (1 + 9). Současně se připraví porovnávací roztok takto: ke 20 ml *chloroformu R* se přidá 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *dithizonu R* (0,02 g/l) v *chloroformu R*, 0,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)* a 0,5 ml směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (2 g/l) (1 + 9). Ihned se oba roztoky intenzivně protřepávají po dobu 1 min. Případné červené zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (5 μg/g).

Těkavé látky. Dimetikony s deklarovanou viskozitou větší než 50 $mm^2.s^{-1}$ vyhovují následující dodatečné zkoušce. Dimetikony s deklarovanou viskozitou 50 $mm^2.s^{-1}$ nebo nižší jsou určeny pouze pro vnější použití.

Nejvýše 0,3 % těkavých látek; 1,00 g se zahřívá 2 h na misce o průměru 60 mm a hluboké 10 mm při 150 °C.

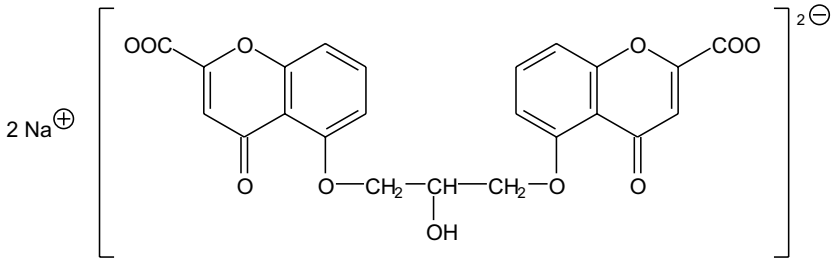
Označování

V označení na obalu se uvede deklarovaná viskozita jako číslo za názvem látky.

† Dinatrii cromoglicas

Chromoglykan disodný

Synonyma. Natrii cromoglicas, Natrium cromoglicicum



$C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$ M_r 512,34 CAS 15826-37-6

Je to disodná sůl kyseliny 5,5′-(2-hydroxy-1,3-propandiyldioxy)bis(4-oxo-4*H*-chromen-2-karboxylové). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek.
Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%, v chloroformu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,4* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 239 nm a 327 nm. Poměr absorbance v maximu při 327 nm k absorbanci v maximu při 239 nm je 0,25 až 0,30.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *chromoglykanu disodného CRL.*

C. Asi 5 mg se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*, přidají se 3 ml směsi obsahující roztok *aminopyrazolonu R* (5 g/l) v *methanolu R* a roztok *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*) v *methanolu R* a směs se nechá 5 min stát; vznikne intenzivní žluté zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je růžový. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,25 ml *červeně methylové RS;* roztok je červený.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonu R*, *tetrahydrofuranu R* a *vody R* (1 + 4 + 6) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *1,3-bis(2-acetyl-3-hydroxyfenoxy)-2-propanolu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 50 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, která zůstává na startu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Šťavelany. 0,10 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 5,0 ml *salicylanu železitého RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 480 nm; absorbance roztoku není menší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 0,35 mg *kyseliny šťavelové R* místo zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší nad *oxidem fosforečným R* při 100 °C až 105 °C a tlaku 300 Pa až 600 Pa.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí zahřátím ve směsi 5 ml *2-propanolu R* a 25 ml *ethylenglykolu R*, ochladí se a přidá se 30 ml *dioxanu R*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,62 mg $C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$.

Uchovávání

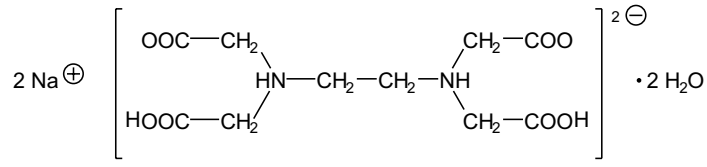
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Dinatrii edetas dihydricus

Dihydrát edetanu disodného

Synonyma. Natrii edetas, Natrium edeticum



$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 . 2H_2O$ M_r 372,24 CAS 6381-92-6

M_r bezvodého 336,21

Je to dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové. Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 . 2H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *edetanu disodného CRL*.

B. 2 g se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 6 ml *dusičnanu olovnatého RS*, protřepe se a potom se přidají 3 ml *jodidu draselného RS;* nevznikne žlutá sraženina. Roztok se zalkalizuje na *papír lakmusový červený R* přidáním *amoniaku zředěného RS2* a přidají se 3 ml *šťavelanu amonného RS;* nevznikne žádná sraženina.

C. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 0,5 ml *chloridu vápenatého RS*. Roztok se zalkalizuje na *papír lakmusový červený R* přidáním *amoniaku zředěného RS2* a přidají se 3 ml *šťavelanu amonného RS;* nevznikne žádná sraženina.

D. Vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,5; měří se roztok S.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (80 μg/g). Před přidáním *kyseliny thioglykolové R* se ke každému roztoku přidá 0,25 g *chloridu vápenatého R*.

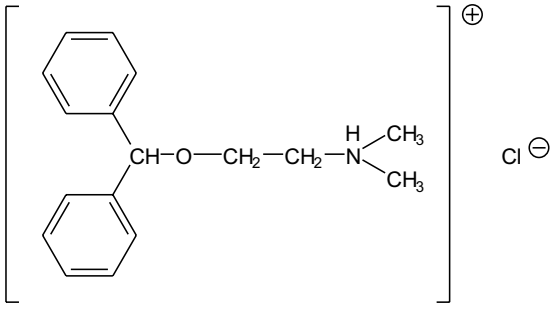
Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 300 ml. Přidají se 2 g *methenaminu R*, 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a titruje se *dusičnanem olovnatým 0,1 mol/l VS* za použití asi 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* jako indikátoru.

1 ml *dusičnanu olovnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,22 mg $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$.

† Diphenhydramini hydrochloridum

Difenhydraminiumchlorid



$C_{17}H_{22}ClNO$ M_r 291,82 CAS 147-24-0

Je to [2-(difenylmethoxy)ethyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{22}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*: 168 °C až 172 °C.

B. 50 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje tři maxima: při 253 nm, 258 nm a 264 nm. Specifické absorbance v uvedených maximech jsou asi 12, 15 a 12.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *difenhydraminiumchloridu CRL*. Měří se tablety látek s *chloridem draselným R*.

D. K 0,05 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *kyseliny sírové R*. Roztok se zbarví intenzivně žlutě a po přidání 0,5 ml *kyseliny dusičné R* červeně. Přidá se 15 ml *vody R,* ochladí se, přidá se 5 ml *chloroformu R* a protřepe se; chloroformová vrstva se zbarví intenzivně fialově.

E. Vyhovuje zkouškám na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S a roztok S pětkrát zředěný jsou čiré *(2.2.1)*. Roztok S není intenzivněji zbarvený než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 6,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Připravuje se těsně před použitím.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R, methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 20 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min na vzduchu, postříká se *kyselinou sírovou R* a zahřívá se 10 min při 120 °C nebo tak dlouho, dokud se neobjeví skvrny. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

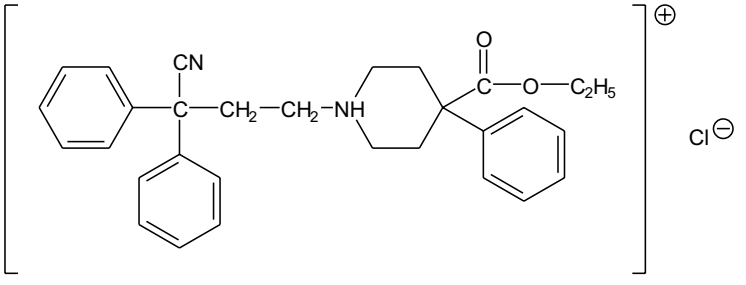
0,250 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,18 mg $C_{17}H_{22}ClNO$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

§§ Diphenoxylati hydrochloridum

Difenoxylatiumchlorid



$C_{30}H_{33}ClN_2O_2$ M_r 489,06 CAS 3810-80-8

Je to 4-ethoxykarbonyl-4-fenyl-1-(3,3-difenyl-3-kyanopropyl)piperidiniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{30}H_{33}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 220 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. difenoxylatiumchloridu.*

B. Asi 30 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R*, přidá se 0,25 ml *kyseliny dusičné R* a 0,4 ml *dusičnanu stříbrného RS1,* protřepe se a nechá se stát; vylučuje se tvarohovitá sraženina. Odstřeďuje se a sraženina se rychle promyje třikrát 2 ml *methanolu R* za ochrany před přímým světlem. Sraženina se suspenduje ve 2 ml *vody R* a přidá se 1,5 ml *amoniaku 17,5% R;* sraženina se snadno rozpustí.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného *silikagelu oktadecylsilanizovaného R* (5 μm) s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 2) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 2) na 100 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,50 g se rozpustí v 25 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (15 g/l) v *methanolu R*, přidá se 1 ml *vody R* a zahřívá se 4 h na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po

ochlazení se přidá 25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS* a třepe se 100 ml *dichlormethanu R* a spodní vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni. Odparek se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 2), přidá se 10 ml zkoušeného roztoku a zředí se stejnou směsí na 25 ml.

Na vrstvu (100 mm x 100 mm) se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *methanolu R,* roztoku *chloridu sodného R* (59 g/l) a *dioxanu R* (10 + 30 + 60) po dráze 7 cm. Vrstva se suší 15 min v sušárně při 160 °C. Horká deska se vloží na 30 min do uzavřené komory s asi 20 ml *kyseliny dusičné dýmavé R.* Pak se deska opět zahřívá 15 min při 160 °C. Po ochlazení se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve 40 ml *lihu 96% R*, přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 48,91 mg $C_{30}H_{33}ClN_2O_2$.

Uchovávání

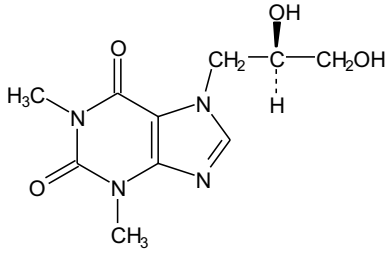
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Omamná látka.

† Diprophyllinum

1998

Diprofylin



a enantiomer

$C_{10}H_{14}N_4O_4$ M_r 254,24 CAS 479-18-5

Je to (*RS*)-7-(2,3-dihydroxypropyl)-1,3-dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{14}N_4O_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 160 °C až 165 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *diprofylinu CRL*. Měří se tablety látek připravené z 0,5 mg až 1 mg zkoušené látky a 0,3 g *bromidu draselného R.*

C. 1 g se rozpustí v 5 ml *acetanhydridu R* a vaří se 15 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 100 ml směsi objemových dílů *etheru R a etheru petrolejového R* (20 + 80) a chladí se v ledové lázni po dobu nejméně 20 min za občasného zatřepání. Zfiltruje se, sraženina se promyje směsí objemových dílů *etheru R* a *etheru petrolejového R* (20 + 80), rekrystalizuje se z *lihu 96% R* a vysuší se ve vakuu. Krystaly tají *(2.2.14)* při 142 °C až 148 °C.

D. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Přidáním nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se změní zbarvení indikátoru na modré.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu* HF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,3 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 30) a zředí se stejným rozpouštědlem na 10 ml. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,2 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *theofylinu R* se rozpustí v *methanolu R*, přidá se 0,3 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Po vysušení vrstvy na vzduchu se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (400 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Při dodržení pořadí přidávaných zkoumadel se zabrání přehřívání reakčního prostředí. Důkladně se míchá a titrace se ukončí ihned po odečtení bodu ekvivalence.

0,200 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50,0 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,42 mg $C_{10}H_{14}N_4O_4$.

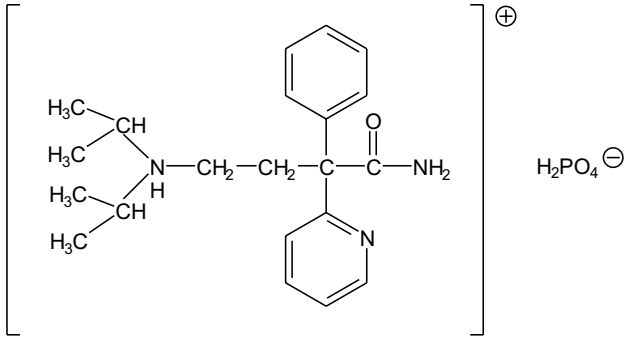
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Disopyramidi dihydrogenophosphas

Disopyramidiumdihydrogenfosfat



$C_{21}H_{32}N_3O_5P$ M_r 437,47 CAS 22059-60-5

Je to (*RS*)-[3-fenyl-3-karbamoyl-3-(2-pyridyl)]-propyldi(isopropyl)-amoniumdihydrogenfosfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{32}N_3O_5P$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.

Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* (5 g/l) v *methanolu R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 240 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 269 nm a prodlevu při 263 nm. Specifická absorbance v maximu je 147 až 163.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *disopyramidiumdihydrogenfosfatu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *disopyramidiumdihydrogenfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, acetonu R* a *cyklohexanu R* (1 + 30 + 30) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

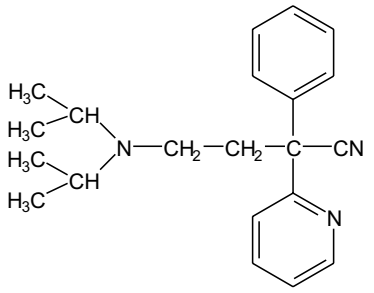
0,180 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,88 mg $C_{21}H_{32}N_3O_5P$.

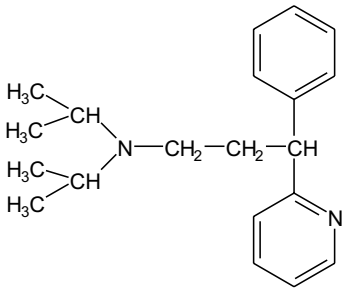
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

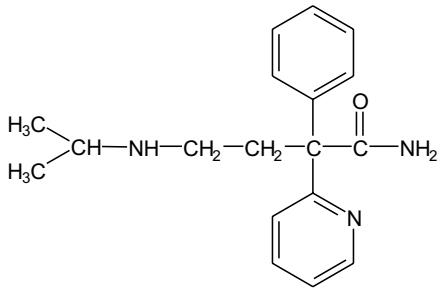
Nečistoty



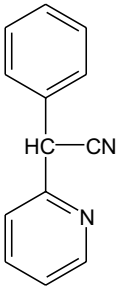
A. 4-[bis(isopropylamino)]-2-fenyl-2-(2-pyridyl)butyronitril (diisopyronitril),



B. 3-fenyl-3-(2-pyridyl)-N,N-diisopropylpropylamin,



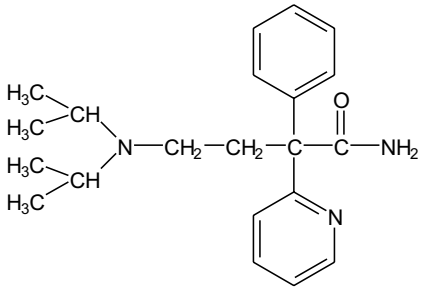
C. 4-isopropylamino-2-fenyl-2-(2-pyridyl)butyramid,



D. 2-fenyl-2-(2-pyridyl)acetonitril (pyronitril).

† Disopyramidum

Disopyramid



$C_{21}H_{29}N_3O$ M_r 339,48 CAS 3737-09-5

Je to (*RS*)-4-[bis(isopropylamino)]-2-fenyl-2-(2-pyridyl)butyramid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{21}H_{29}N_3O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 40,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* (5 g/l) v *methanolu R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 240 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 269 nm a prodlevu při 263 nm. Specifická absorbance v maximu je 190 až 210.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *disopyramidu CRL*. Měří se látky ve formě tablet s *bromidem draselným R* připravené nanesením po 50 μl roztoků látek v *dichlormethanu R* (50 g/l) a 1 h sušené při 60 °C.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *disopyramidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, acetonu R* a *cyklohexanu R* (1 + 30 + 30) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h nad *oxidem fosforečným R* při 80 °C a při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g.

Stanovení obsahu

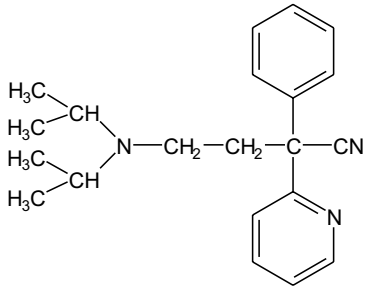
0,130 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,97 mg $C_{21}H_{29}N_3O$.

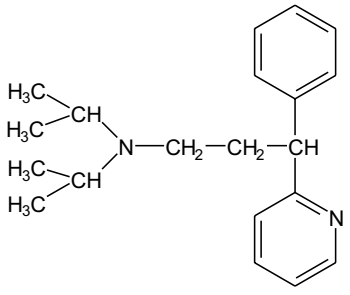
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

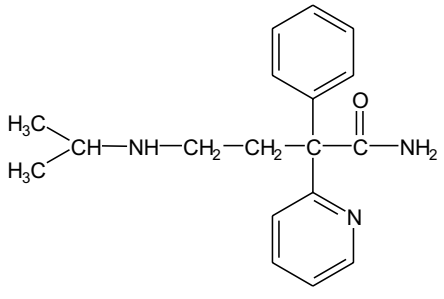
Nečistoty



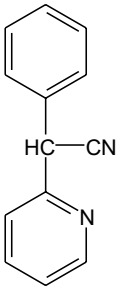
A. 4-[bis(isopropylamino)]-2-fenyl-2-(2-pyridyl)butyronitril (diisopyronitril),



B. 3-fenyl-3-(2-pyridyl)-N,N-diisopropylpropylamin,



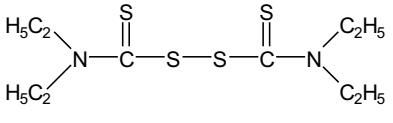
C. 4-isopropylamino-2-fenyl-2-(2-pyridyl)butyramid,



D. 2-fenyl-2-(2-pyridyl)acetonitril (pyronitril).

† Disulfiramum

Disulfiram



$C_{10}H_{20}N_2S_4$ $_r$ 296,52 CAS 97-77-8

Je to bis(diethylthiokarbamoyl)disulfid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{20}N_2S_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v etheru, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 70 °C až 73 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *disulfiramu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a přidají se 2 ml roztoku *chloridu měďnatého R* (0,5 g/l) v *methanolu R;* vzniká žluté zbarvení, které přechází na zelenožluté.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *ethylacetatu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *ethylacetatem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *disulfiramu CRL* se rozpustí v *ethylacetatu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *ethylacetatem R* na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *butylacetatu R* a *hexanu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Diethyldithiokarbamat. 0,20 g se rozpustí v 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, přidá se 5 ml *tlumivého roztoku o pH 8,0* a důkladně se protřepe. Etherová vrstva se odstraní a vodná vrstva se promyje 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. K vodné vrstvě se přidá 0,2 ml roztoku *síranu měďnatého R* (4 g/l) a protřepe se 5 ml *cyklohexanu R*. Případné žluté zbarvení horní vrstvy není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně za stejných podmínek za použití 0,2 ml čerstvě připraveného roztoku *diethyldithiokarbaminanu sodného R* (0,15 g/l) místo zkoušené látky (150 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu při 50 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,450 g se rozpustí v 80 ml *acetonu R,* přidá se 20 ml roztoku *dusičnanu draselného R* (20 g/l) a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*, za použití stříbrné elektrody jako indikační a argentchloridové elektrody naplněné nasyceným roztokem *dusičnanu draselného R* jako srovnávací.

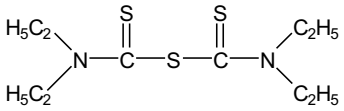
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 59,30 mg $C_{10}H_{20}N_2S_4$.

Uchovávání

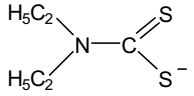
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



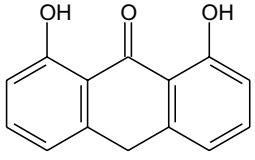
A. sulfiram,



B. diethyldithiokarbamat.

Dithranolum

Dithranol



$C_{14}H_{10}O_3$ M_r 226,23 CAS 480-22-8

Je to 1,8-dihydroxyanthracen-9(10*H*)-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{10}O_3$.

Vlastnosti

Žlutý až hnědožlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Všechny zkoušky se provádějí za ochrany před světlem a použijí se čerstvě připravené roztoky.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 178 °C až 182 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *dithranolu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *dithranolu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). Asi 5 mg *danthronu R* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl roztoků a vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *hexanu R* a *dichlormethanu R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se vystaví působení par amoniaku do objevení skvrn a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svojí polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K 5 mg se přidá 0,1 g *octanu sodného bezvodého R* a 1 ml *acetanhydridu R* a 30 s se vaří. Pak se přidá 20 ml *lihu 96% R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm; roztok vykazuje modrou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky.

A. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,200 g se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R*, přidá se 1,0 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *hexanem R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. Rozpustí se po 10,0 mg *anthronu R*, *danthronu R*, *dithranolu nečistoty C CRL* a *dithranolu CRL* v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 19,0 ml *dichlormethanu R*, 1,0 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *hexanem R* na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm).
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *dichlormethanu R* a *hexanu R* (1 + 5 + 82), s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 260 nm.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času dithranolu nečistoty C. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku činila asi 70 % celé stupnice zapisovače. Jestliže jsou chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, eluují se látky v tomto pořadí: dithranol, danthron, anthron, dithranol nečistota C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píkem dithranolu a píkem danthronu nejméně 2,0. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha jednotlivých píků odpovídajících anthronu, danthronu nebo dithranolu nečistotě C větší než plocha odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku, píků odpovídajících anthronu, danthronu nebo dithranolu nečistotě C, není větší než plocha píku dithranolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

B. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 25,0 mg *dithranolu nečistoty D CRL* a 25,0 mg *dithranolu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové kolony délky 0,20 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *tetrahydrofuranu R* a *vody R* (2,5 + 40 + 60), s průtokovou rychlostí 0,9 ml/min.

Nastříkne se odděleně 20 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času dithranolu. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku byla asi 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je rozlišení mezi píkem dithranolu nečistoty D a dithranolem nejméně 2,5. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku dithranolu nečistoty D větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (2,5 %).

Celkový obsah příbuzných látek stanovený ve zkoušce A a ve zkoušce B není větší než 3,0 %.

Chloridy (*2.4.4*). 1,0 g se protřepává 1 min s 20 ml *vody R* a pak se zfiltruje. 10 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml.

Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (2.4.14). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50 ml *pyridinu bezvodém R* a pod *dusíkem R* se titruje *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence a použití skleněné elektrody jako indikační a srovnávací kalomelové elektrody obsahující jako elektrolyt nasycený roztok *chloridu draselného R* v *methanolu R*.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,62 mg $C_{14}H_{10}O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

A. anthron,

B. danthron,

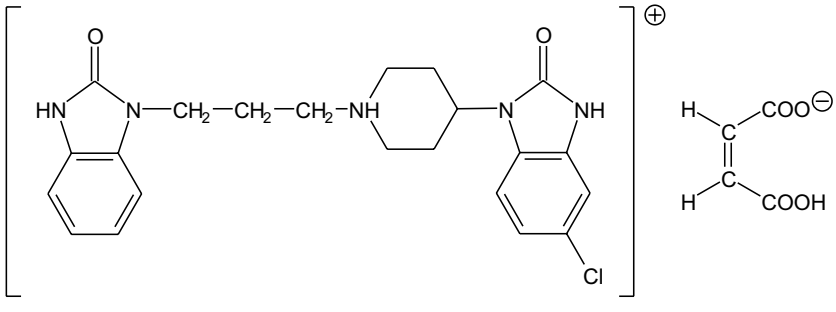
C. dimer dithranolu,

D. 1-hydroxy-9-anthron.

† Domperidoni hydrogenomaleas

Domperidoniumhydrogenmaleinat

Synonymum. Domperidoni maleas



$C_{26}H_{28}ClN_5O_6$ M_r 541,99 CAS 99497-03-7

Je to 4-(5-chlor-2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]piperidiniumhydrogen(*Z*)butendioat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{26}H_{28}ClN_5O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dimethylformamidu, těžce rozpustný v methanolu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *domperidoniumhydrogenmaleinatu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v minimálním množství *2-propanolu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *domperidoniumhydrohenmaleinatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *domperidoniumhydrogenmaleinatu CRL* a 20 mg *droperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu, vystaví se působení par jodu do objevení skvrn a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. 0,1 g se smíchá se směsí 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 3 ml *vody R* a protřepe se třikrát 5 ml *etheru R*. K 0,1 ml vodné vrstvy se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R*. Směs se zahřívá 15 min na vodní lázni; nevzniká žádné zbarvení. Ke zbytku vodné vrstvy se přidají 2 ml *bromu RS*. Směs se opět 15 min zahřívá na vodní lázni a pak se zahřeje k varu. Po ochlazení se k 0,1 ml roztoku přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R*. Zahřívá se 15 min na vodní lázni; vzniká fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,20 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 20,0 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví v čas potřeby*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *domperidoniumhydrogenmaleinatu CRL* a 15,0 mg *droperidolu CRL* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (3 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *octanu amonného R* (5 g/l) (3 + 7). Směs se v průběhu 10 min mění lineárním gradientem na *methanol R* a následuje eluce *methanolem R* po dobu 2 min. Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Kolona se ustaluje nejméně 30 min *methanolem R* a pak nejméně 5 min mobilní fází počátečního složení.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu s 10 μl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: domperidoniumhydrogenmaleinatu asi 6,5 min, droperidolu asi 7 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky domperidoniumhydrogenmaleinatu a droperidolu není menší než 2,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace methanolu v mobilní fázi nebo časový program lineárního gradientu.

Nastříkne se odděleně 10 μl *dimethylformamidu R* jako kontrolní tekutiny, 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku na chromatogramu kontrolní tekutiny a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny oranžově žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 54,20 mg $C_{26}H_{28}ClN_5O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 5-chlor-2,3-dihydro-1-(4-piperidyl)-1*H*-benzimidazol-2-on,

B. 4-(5-chlor-2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-formylpiperidin,

C. 1-oxid *cis*-5-chlor-1-{1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidyl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-onu,

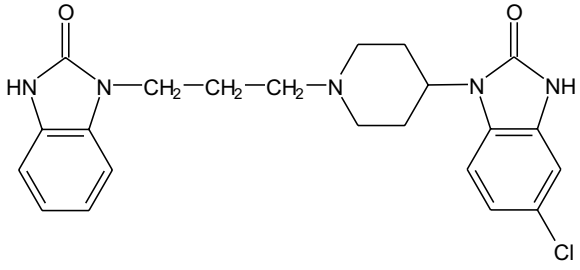
D. 5-chlor-3-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-1-{1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*--benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidyl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on,

E. 1-{3-[4-(5-chlor-2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-piperidyl]propyl}-3-[3-(2,3-dihydro--2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on,

F. 1,1′-[(1,2-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1,3-diyl)di(propan-3,1-diyl)di(piperidin-1,4-diyl)]bis- [5-chlor-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on].

† Domperidonum

Domperidon



$C_{22}H_{24}ClN_5O_2$ M_r 425,92 CAS 57808-66-9

Je to 5-chlor-1-{1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidyl}-2,3-dihydro--1*H*-benzimidazol-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{24}ClN_5O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dimethylformamidu, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 244 °C až 248 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *domperidonu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *domperidonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *domperidonu CRL* a 20 mg *droperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu, vystaví se působení par jodu do objevení skvrn a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,20 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 20,0 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví v čas potřeby.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *domperidonu CRL* a 15,0 mg *droperidolu CRL* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek* (3 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *octanu amonného R* (5 g/l) (3 + 7). Směs se v průběhu 10 min mění lineárním gradientem na *methanol R* a následuje eluce *methanolem R* po dobu 2 min. Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Kolona se ustaluje nejméně 30 min *methanolem R* a pak nejméně 5 min mobilní fází počátečního složení.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu s 10 µl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: domperidonu asi 6,5 min a droperidolu asi 7 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky domperidonu a droperidolu není menší než 2,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace methanolu v mobilní fázi nebo časový program lineárního gradientu.

Nastříkne se odděleně 10 µl *dimethylformamidu R* jako kontrolní tekutiny, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku kontrolní tekutiny a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7), přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny oranžově žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 42,59 mg $C_{22}H_{24}ClN_5O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 5-chlor-2,3-dihydro-1-(4-piperidyl)-1*H*-benzimidazol-2-on,

B. 4-(5-chlor-2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-formylpiperidin,

C. 1-oxid *cis*-5-chlor-1-{1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidyl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-onu,

D. 5-chlor-3-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-1-{1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*--benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidyl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on,

E. 1-{3-[4-(5-chlor-2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-piperidyl]propyl}-3-[3-(2,3-dihydro--2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)propyl]-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on,

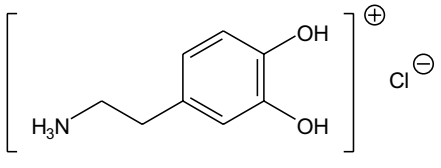
F. 1,1′-[(1,2-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1,3-diyl)di(propan-3,1-diyl)di(piperidin-1,4-diyl)]bis- [5-chlor-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on].

†† Dopamini hydrochloridum

1998

Dopaminiumchlorid

Synonymum. Dopaminium chloratum



$C_8H_{12}ClNO_2$ M_r 189,64 CAS 62-31-7

Je to [2-(3,4-dihydroxyfenyl)-ethyl]amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_8H_{12}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v acetonu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 280 nm. Specifická absorbance v maximu je 136 až 150.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dopaminiumchloridu CRL*. Tablety se připraví za použití *chloridu draselného R*.

C. Asi 5 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 5 ml *vody R*. Po přidání 0,1 ml *dusitanu sodného RS* obsahujícího *molybdenan amonný R* (100 g/l) vzniká žluté zbarvení, které přejde v červené po přidání *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

D. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R* a přidá se 0,2 ml *chloridu železitého RS2;* vzniká zelené zbarvení, které po přidání 0,1 g *methenaminu R* přechází na modrofialové.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,4 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_6 nebo $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,75 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidá se 1,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,15 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 7,5 mg *4-O-methyldopaminiumchloridu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 7,5 mg *3-O-methyldopaminiumchloridu R* a 7,5 mg *4-O-methyldopaminiumchloridu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R, methanolu R* a *chloroformu R* (2 + 7 + 36 + 52) po dráze 15 cm. Vrstva se 15 min suší na vzduchu a dostatečně se postříká čerstvě připravenou směsí stejných objemových dílů *hexakyanoželezitanu draselného RS* a *chloridu železitého RS1*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna o R_F vyšším, než je R_F hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

V průběhu titrace se důkladně míchá, aby nedocházelo k přehřívání reakční směsi. Titrace se ukončí ihned po dosažení bodu ekvivalence.

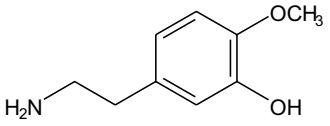
0,1500 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,96 mg $C_8H_{12}ClNO_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

Nečistoty



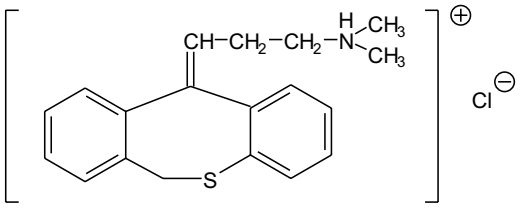
A. 5-(2-aminoethyl)-2-methoxyfenol(4-O-methyldopamin).

† Dosulepini hydrochloridum

N

Dosulepiniumchlorid

Synonymum. Dosulepinium chloratum



$C_{19}H_{22}ClNS$ M_r 331,90 CAS 897-15-4

Je to (*E*)-{3-(6,11-dihydrodibenzo[*b*,*e*]thiepin-11-yliden)propyl}-dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{22}ClNS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý mikrokrystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 75,0 mg se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 220 nm až 350 nm, roztok vykazuje absorpční maximum při 231 nm a 306 nm a absorpční minimum při 291 nm. Specifická absorbance v maximu při 231 nm je 655 až 724 a v maximu při 306 nm je 70 až 77.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *dosulepiniumchloridu CRL*.

C. Asi 2 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové R* a nechá se 5 min stát; vznikne hnědavě červené zbarvení.

D. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH. 4,2 až 5,2, měří se roztok S.

Cizí organické látky. Provedou se dvě tenkovrstvé chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *dosulepinu nečistoty A CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *dosulepinu nečistoty B CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *dosulepinu nečistoty C CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 5 mg *dosulepinu nečistoty D CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 5 mg *dosulepiniumchloridu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (f). 5 mg *dosulepiniumchloridu CRL*, 5 mg *dosulepinu nečistoty A CRL*, 5 mg *dosulepinu nečistoty B CRL* a 5 mg *dosulepinu nečistoty C CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml
Porovnávací roztok (g). 5 mg *dosulepinu nečistoty D CRL* a 5 mg *dosulepiniumchloridu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Chromatografie 1. Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl všech roztoků, kromě porovnávacího roztoku (d) a porovnávacího roztoku (g), a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *2-propanolu R* a *dichlorethanu R* (1 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající dosulepinu nečistotě A, dosulepinu nečistotě B a dosulepinu nečistotě C není intenzivnější než odpovídající skvrny na příslušných chromatogramech porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících dosulepinu nečistotě A, dosulepinu nečistotě B a dosulepinu nečistotě C, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

Chromatografie 2. Na vrstvu se odděleně nanese 5 μl zkoušeného roztoku, 5 μl porovnávacího roztoku (d), 5 μl porovnávacího roztoku (e) a 5 μl porovnávacího roztoku (g) a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R* a *hexanu R* (0,5 + 40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a hodnotí se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající dosulepinu nečistotě D není intenzivnější než skvrna na chroma

togramu porovnávacího roztoku (d) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající dosulepinu nečistotě D, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (g) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

***Z*-Izomer.** Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R*, *1-propanolu R* a *hexanu R* (18 + 24 + 58) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem aminopropylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) se specifickou plochou 500 m^2 a velikostí póru 8 nm,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *methanolu R* obsahujícího 0,15 % (*V/V*) *kyseliny chloristé R, 1-propanolu R* a *hexanu R* (18 + 24 + 58), průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje na 20 °C až 25 °C. Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku. Za dodržení popsaných podmínek stanovení je relativní retenční čas *Z*-izomeru vzhledem k *E*-izomeru 0,875.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi druhým píkem (*E*-izomer) a prvním píkem (*Z*-izomer) je nejméně 1,5. Poměr plochy píku odpovídajícího *E*-izomeru k ploše píku odpovídajícího *Z*-izomeru je nejméně 19 (nejvýše 5 % *Z*-izomeru).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,600 g se rozpustí ve 100 ml *acetonu R*, přidá se 15 ml *octanu rtuťnatého RS* a 3 ml *oranže methylové RS1* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení.

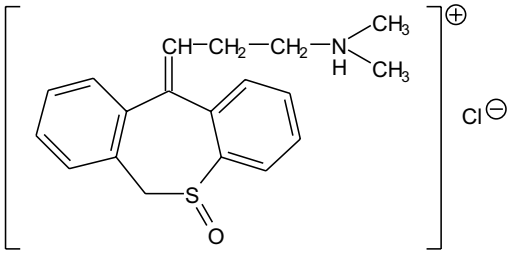
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,19 mg sloučeniny $C_{19}H_{22}ClNS$.

Uchovávání

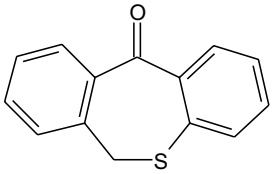
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Separandum.

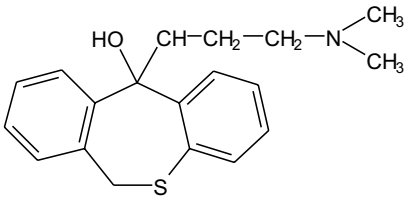
Nečistoty



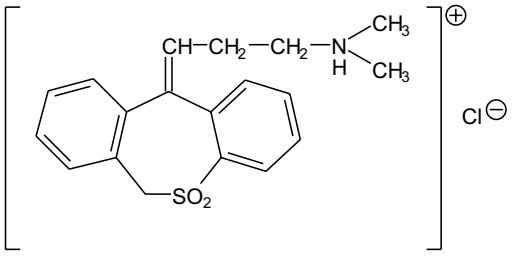
A. 11-(3-dimethylaminopropyliden)-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-5-oxid(hydrochlorid),



B. 6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-11-on,



C. 11-(3-dimethylaminopropyl)-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-11-ol,

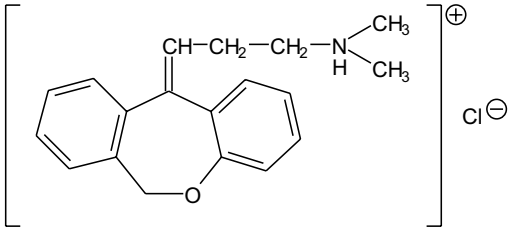


D. 11-(3-dimethylaminopropyliden)-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-5,5-dioxid(hydrochlorid),

E. *Z*-izomer dosulepiniumchloridu.

† Doxepini hydrochloridum

Doxepiniumchlorid



$C_{19}H_{22}ClNO$ M_r 315,84 CAS 1229-29-4

Je to směs *E*- a *Z*-izomerů N,N-dimethyl-3-(6,11-dihydro-dibenz[*b,e*]oxepin-11-yliden)propylamoniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{22}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 185 °C až 191 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (1 g/l) v *methanolu R* a zředí se stejným roztokem na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (1 g/l) v *methanolu R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 297 nm. Specifická absorbance v maximu je 128 až 142.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. doxepiniumchloridu CRL.*

D. Asi 5 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové R;* vznikne tmavě červené zbarvení.

E. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok. 2 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 5 + 94,5) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

***Z*-Izomer.** Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné kuličkami *silikagelu oktylsilanizovaného pro chromatografii R* (5 μm) se specifickou plochou 220 m^2/g a velikostí póru 80 nm,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (30 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 2,5, (30 + 70). Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C. Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem *(E*-izomer) a druhým píkem (*Z*-izomer) je nejméně 1,5. Poměr plochy píku odpovídajícího *E*-izomeru k ploše píku odpovídajícího *Z*-izomeru je 4,4 až 6,7 (13,0 % až 18,5 % *Z*-izomeru).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 35 ml *acetanhydridu R*, přidá se 0,2 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny modrého zbarvení na zelené.

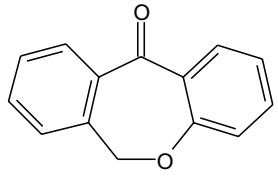
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,58 mg sloučeniny $C_{19}H_{22}ClNO$.

Uchovávání

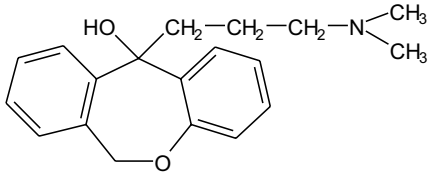
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



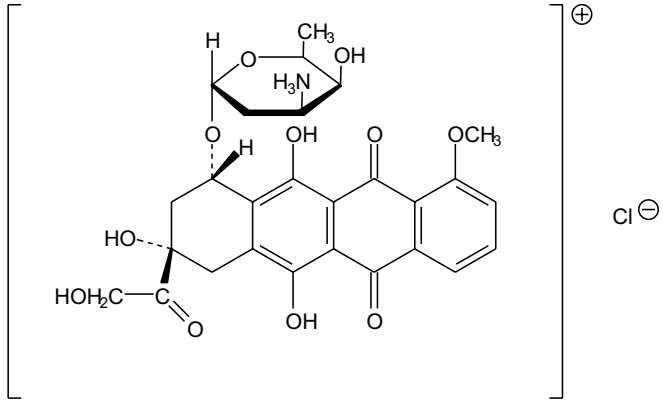
A. 6,11-dihydrodibenz[*b,e*]oxepin-11-on,



B. (*RS*)-11-(3-dimethylaminopropyl)-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]oxepin-11-ol.

†† Doxorubicini hydrochloridum

Doxorubiciniumchlorid



$C_{27}H_{30}ClNO_{11}$ M_r 579,99 CAS 25316-40-9

Je to (1*S*,3*S*)-(1,2,3,4,6,11-hexahydro-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-3-hydroxyacetyl-6,11-dioxonaftacen-1-yl)-3-amonio-2,3,6-trideoxy-α-L-*lyxo*-hexapyranosid-chlorid. Tato látka je produkována určitými kmeny *Streptomyces coeruleorubidus* nebo *Streptomyces peucetius* nebo získaná jinými způsoby. Počítáno na bezvodou a rozpouštědel prostou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$.

Vlastnosti

Oranžovočervený krystalický hygroskopický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml. Roztok měřený v rozmezí 220 nm až 550 nm (*2.2.25*) vykazuje šest maxim, při 234 nm, 252 nm, 288 nm, 475 nm, 495 nm a 530 nm.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *doxorubiciniumchloridu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a liší se polohou od hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 0,5 ml *kyseliny dusičné R*, přidá se 0,5 ml *vody R* a zahřívá se 2 min nad plamenem. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1;* vznikne bílá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 5,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 50 mg ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok (a). 50 mg se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *doxorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *daunorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *doxorubiciniumaglykonu CRL* (doxorubicinon) se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 40 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně jako 5mm proužky po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 2 + 15 + 82) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a ihned se hodnotí. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající doxorubiciniumaglykonu nepřevyšuje intenzitou hlavní skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Žádná skvrna mimo hlavní skvrnu a skvrnu příslušející doxorubiciniumaglykonu nepřevyšuje intenzitou hlavní skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %).

Aceton a ethanol. Nejvýše 2,0 %, z toho aceton nejvýše 0,5 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *dioxanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v 1,0 ml *vody R* obsahující *dioxan R* (1 g/l).
Porovnávací roztok. 0,50 g *ethanolu R*, 0,50 g *acetonu R* a 1,00 g *dioxanu R* se smíchá a zředí se *vodou R* na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou pro chromatografii R1* impregnovanou 10 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 70 °C, nástřikového prostoru a detektoru 125 °C. Nastřikuje se po 1 μl každého roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 4 %, provede se s 0,100 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 2,2 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *doxorubiciniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *doxorubiciniumchloridu CRL* a 10,0 mg *epirubiciniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml z tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min, která je směsí objemových dílů *methanolu R1*, *acetonitrilu R*, roztoku *laurylsíranu sodného R* (2,88 g/l) a *kyseliny fosforečné R* (2,30 g/l) (5 + 45 + 50),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se šestkrát po 20 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu rozlišení mezi píky doxorubicinu a epirubicinu je nejméně 2,0 a je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku doxorubicinu nejvýše 1,0 %.

Nejsou-li splněny tyto požadavky, upraví se pracovní podmínky. Nastříkne se 20 μl zkoušeného a 20 μl porovnávacího roztoku (a) a vypočítá se obsah $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$ v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Venenum.

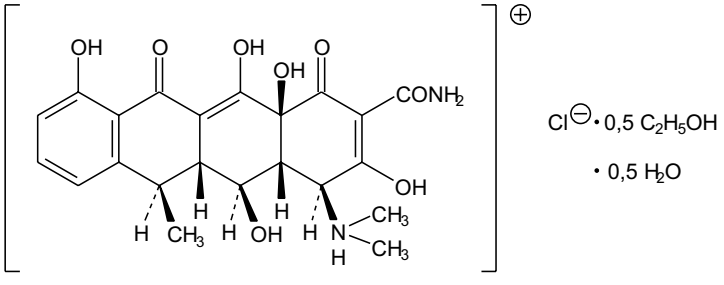
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

† Doxycyclini hyclas

Doxycykliniumhyklat

Synonymum. Doxycyclinium chloratum



$C_{22}H_{25}ClN_2O_8$. $0{,}5C_2H_6O$. $0{,}5H_2O$ M_r 512,94 CAS 24390-14-5

Je to hemihydrát a hemiethanolát (4*S*,4a*R*,5*S*,5a*R*,6*R*,12a*S*)-(1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-2-karbamoyl-6-methyl-1,11-dioxo-4-naftacenyl)dimethylamonium-chloridu, antibiotikum získané z oxytetracyklinu nebo metacyklinu nebo jiným způsobem.

Počítáno na bezvodou a ethanolu prostou látku, obsahuje 88,0 % až 94,0 % sloučeniny ($C_{22}H_{24}N_2O_8$; M_r 444,44).

Vlastnosti

Žlutý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na 9,0, (asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm). Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* a 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vzniká žluté zbarvení.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,0 až 3,0; měří se následující roztok: 0,1 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.27*). -105° až -120°, počítáno na bezvodou a ethanolu prostou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředěním stejnou směsí na 25,0 ml. Měření se provede do 5 min od přípravy roztoku.

Absorbance (*2.2.25*). 25,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se stejnou směsí na 25,0 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml. Specifická absorbance v maximu při 349 nm je 300 až 335, počítáno na bezvodou, ethanolu prostou látku. Měření se provede do 1 h od přípravy roztoku.

Světlo absorbující nečistoty. 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 490 nm a počítaná na bezvodou, ethanolu prostou látku není větší než 0,07. Měření se provede do 1 h od přípravy roztoku.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu. Nastříknou se zkoušený roztok a porovnávací roztok (e). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího metacyklinu nebo 6-epidoxycyklinu není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (2,0 %); plocha žádného píku mezi píkem rozpouštědla a píkem odpovídajícím metacyklinu a plocha každého píku, který se objeví na konci sestupné části hlavního píku, není větší než 25 % plochy píku odpovídající 6-epidoxycyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,5 %).

Ethanol. 4,3 % až 6,0 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*). Jako vnitřní standard se použije *1-propanol R*.

Roztok vnitřního standardu. 0,50 ml *1-propanolu R* se zředí *vodou R* na 1000,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,10 g zkoušené látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,10 g zkoušené látky se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,50 ml *ethanolu R* se zředí na 100,0 ml roztokem vnitřního standardu. 1,0 ml tohoto roztoku se roztokem vnitřního standardu zředí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),

- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 135 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 150 °C. Nastříkne se zvolený objem obou zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku. Obsah ethanolu se vypočítá za použití hustoty (*2.2.5*) 0,790 g/ml při 20 °C.

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 1,4 % až 2,8 %; stanoví se s 1,20 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,4 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1,14 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *6-epidoxycykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *metacykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). Smíchají se 4,0 ml porovnávacího roztoku (a), 1,5 ml porovnávacího roztoku (b), 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (e). Smíchá se 2,0 ml porovnávacího roztoku (b), 2,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm) a udržované při 60 °C,
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: naváží se 60,0 g *terc.butanolu R* a přenese se do odměrné baňky na 1000 ml za pomoci 200 ml *vody R*. Přidá se 400 ml *tlumivého roztoku o pH 8,0*, 50 ml roztoku *tetrabutylamoniumdihydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 8,0, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (40 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 8,0, a zředí se *vodou R* na 1000 ml. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 μl,
- elektronického integrátoru.

Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastaví se citlivost tak, aby výška píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu rozlišení mezi prvním píkem (metacyklin) a druhým píkem (6-epidoxycyklin) je nejméně 1,25 a rozlišení mezi druhým píkem a třetím píkem (doxycyklin) je nejméně 2,0. Podle potřeby se upraví obsah

terc.butanolu v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, je-li faktor symetrie třetího píku nejvýše 1,25. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku doxycyklinu nejvýše 1,0 %. Podle potřeby se upraví parametry integrátoru. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Obsah doxycyklinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

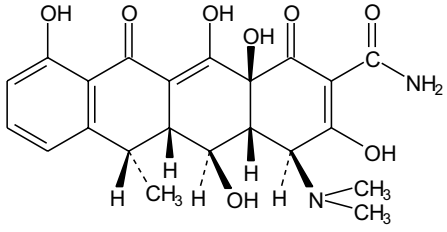
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

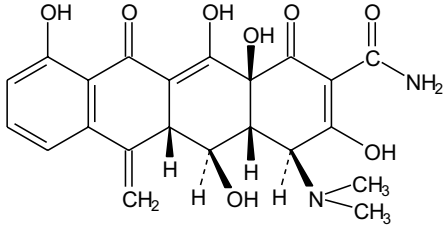
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

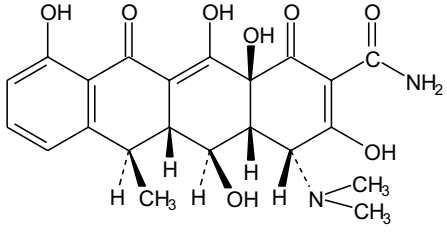
Nečistoty



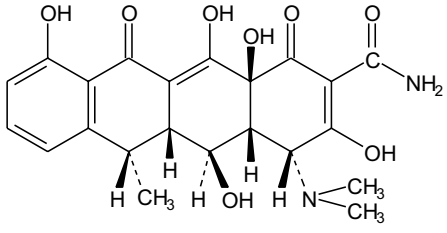
A. 6-epidoxycyklin,



B. metacyklin,

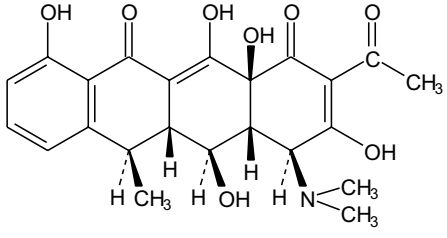


C. 4-epidoxycyklin,



D. 4,6-epidoxycyklin,

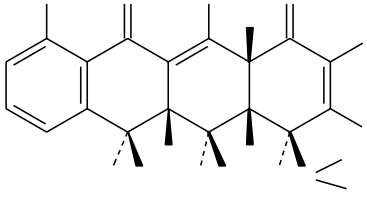
E. oxytetracyklin,



F. 2-acetyl-2-dekarboxamidodoxycyklin.

† Doxycyclinum

Doxycyklin



$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$ M_r 462,46 CAS 17086-28-1

M_r bezvodého 444,44

Je to monohydrát (4*S*,4a*R*,5*S*,5a*R*,6*R*,12a*S*)-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-naftacenkarboxamid. Získává se z oxytetracyklinu nebo metacyklinu nebo se připravuje jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{24}N_2O_8$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na 9,0, (asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm). Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* a 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vzniká žluté zbarvení.

C. 25 mg se rozpustí ve směsi 0,2 ml *kyseliny dusičné zředěné R* a 1,8 ml *vody R*. Roztok nedává reakci (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se suspenze 0,1 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.27*). -113° až -130°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *methanolu R* (0,5 + 99,5) a zředěním stejnou směsí na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 25,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *methanolu R* (0,5 + 99,5) a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (0,5 + 99,5) na 100,0 ml. Specifická absorbance při 349 nm je 325 až 363, počítáno na bezvodou látku. Měření se provede do 1 h od přípravy roztoku.

Světlo absorbující nečistoty. 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *methanolu R* (0,5 + 99,5) a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 10,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 490 nm a počítaná na bezvodou látku není vyšší než 0,07. Měření se provede do 1 h od přípravy roztoku.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu. Nastříknou se zkoušený roztok a porovnávací roztok (e). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího metacyklinu nebo 6-epidoxycyklinu není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (2 %); plocha žádného píku mezi píkem rozpouštědla a píkem odpovídajícím metacyklinu a plocha píku, který se objeví na konci sestupné části hlavního píku, není větší než 25 % plochy píku odpovídající 6-epidoxycyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,5 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,6 % až 4,6 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,4 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*)

Zkoušený roztok. 20,0 mg zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *6-epidoxycykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *metacykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (d). Smíchají se 4,0 ml porovnávacího roztoku (a), 1,5 ml porovnávacího roztoku (b), 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se na 25,0 ml *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS*.

Porovnávací roztok (e). Smíchá se 2,0 ml porovnávacího roztoku (b), 2,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se na 100,0 ml *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm) a udržované při 60 °C,
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: naváží se 60,0 g *terc.butanolu R* a přenese se do odměrné baňky na 1000 ml za pomoci 200 ml *vody R*. Přidá se 400 ml *tlumivého roztoku o pH 8,0*, 50 ml roztoku *tetrabutylamoniumdihydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 8,0, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (40 ml/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 8,0, a zředí se *vodou R* na 1000 ml. Průtoková rychlost je 1,0 ml za minutu,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 μl,
- elektronického integrátoru.

Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastaví se citlivost tak, aby výška píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu je rozlišení mezi prvním píkem (metacyklin) a druhým píkem (6-epidoxycyklin) nejméně 1,25 a rozlišení mezi druhým píkem a třetím píkem (doxycyklin) nejméně 2,0. Podle potřeby se upraví obsah terc.butanolu v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, je-li faktor symetrie třetího píku nejvýše 1,25. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku doxycyklinu nejvýše 1,0 %. Podle potřeby se upraví parametry integrátoru. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

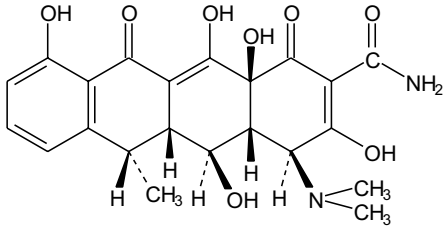
Obsah doxycyklinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

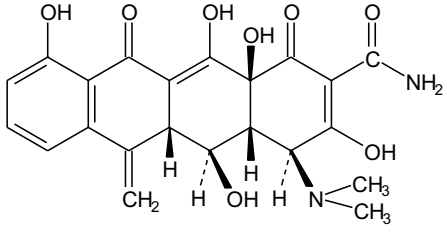
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

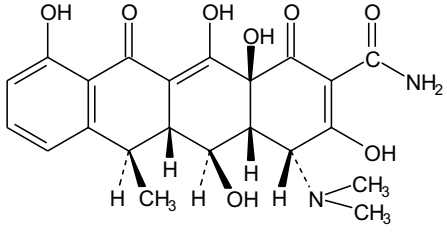
Nečistoty



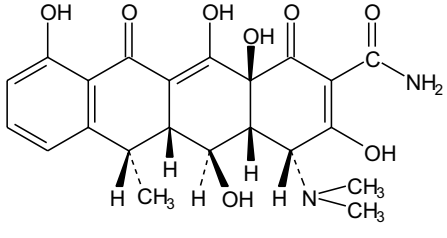
A. 6-epidoxycyklin,



B. metacyklin,

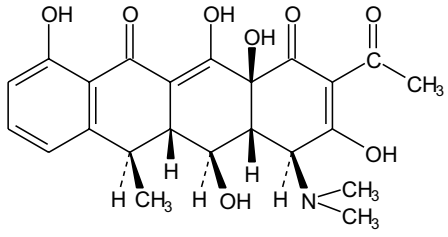


C. 4-epidoxycyklin,



D. 4,6-epidoxycyklin,

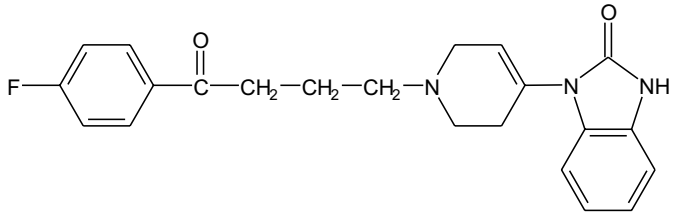
E. oxytetracyklin,



F. 2-acetyl-2-dekarboxamidodoxycyklin.

† Droperidolum

Droperidol



$C_{22}H_{22}FN_3O_2$ M_r 379,43 CAS 548-73-2

Je to 1-{1-[4-(4-fluorfenyl)-4-oxobutyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{22}FN_3O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu a v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *droperidolu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v minimálním množství *acetonu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 30 mg *droperidolu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 30 mg *droperidolu CRL* a 30 mg *benperidolu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R* (1 + 9) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *ethanolu R*, přidá se 0,5 ml *dinitrobenzenu RS* a 0,5 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS;* vznikne fialové zbarvení, které se po 20 min změní na zbarvení hnědočervené.

D. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku až do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se ochladit, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do odbarvení roztoku. Zfiltruje se a 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanoxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se stát 5 min a porovná se zbarvení roztoku se zbarvením kontrolního roztoku připraveného současně stejným způsobem. Zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20,0 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví v čas potřeby.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *droperidolu CRL* a 2,5 mg *benperidolu CRL* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (3 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l) a *acetonitrilu R*. Mobilní fáze se v průběhu 15 min mění lineárním gradientem na směs objemových dílů roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l) a *acetonitrilu R* (6 + 4) a následuje eluce touto směsí po dobu 5 min. Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 275 nm.

Kolona se ustaluje nejméně 30 min *acetonitrilem R* a pak nejméně 5 min mobilní fází počátečního složení.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu s 10 µl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy benperidolu asi 6,5 min, droperidolu asi 7 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky benperidolu a droperidolu je nejméně 2,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo časový program lineárního gradientu.

Nastříkne se odděleně 10 µl *dimethylformamidu R* jako kontrolní tekutiny, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha

žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku kontrolní tekutiny a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7), přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny oranžově žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,94 mg sloučeniny $C_{22}H_{22}FN_3O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 2,3-dihydro-1-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-1*H*-benzimidazol-2-on,

B. 1-{1-[4-(2-fluorfenyl)-4-oxobutyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol- -2-on,

C. 4-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1-[4-(4-fluorfenyl)-4-oxobutyl]pyridiniumchlorid,

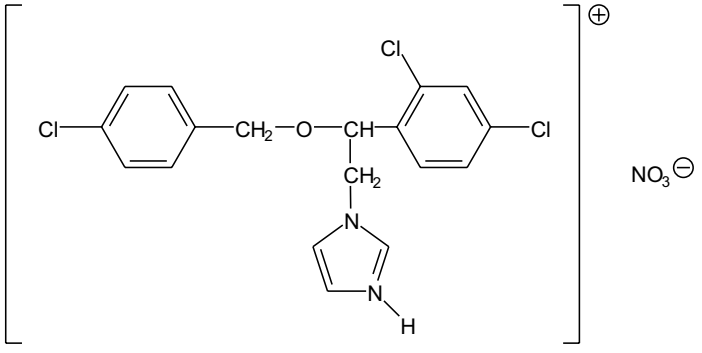
D. N-oxid 1-{1-[4-(4-fluorfenyl)-4-oxobutyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl}-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-2-onu,

E. 2,3-dihydro-1-[1-[4-[4-[4-(2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-benzimidazol-1-yl)-1,2,3,6-tetrahydropyridin-1- -yl]-1-oxobutyl]fenyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl]-1*H*-benzimidazol-2-on.

1586

† Econazoli nitras

Ekonazoliumnitrat



$C_{18}H_{16}Cl_3N_3O_4$ M_r 444,70 CAS 68797-31-9

Je to (*RS*)-1-[2,4-dichlor-β-(4-chlorbenzoyloxy)fenethyl]imidazoliumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{18}H_{16}Cl_3N_3O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 161 °C až 166 °C.

B. 40 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a *2-propanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 240 nm až 320 nm. Roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 265 nm, 271 nm a 280 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 271 nm k absorbanci naměřené v maximu při 280 nm je 1,55 až 1,70. Zkoušku lze hodnotit, jestliže při zkoušce na rozlišovací schopnost *(2.2.25)* poměr absorbancí je nejméně 2.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ekonazoliumnitratu CRL*.

D. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm, před postřikem. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok stupně 7 nejpodobnějšího barevného odstínu *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 9) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 9) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *toluenu R* a *dioxanu R* (1 + 40 + 60) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným RS2* a pozoruje se v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je zřetelně viditelná skvrna.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,4000 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,47 mg $C_{18}H_{16}Cl_3N_3O_4$.

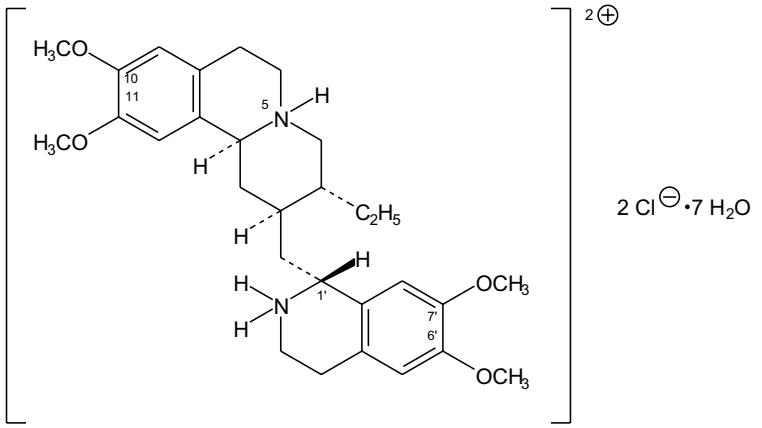
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Emetini dihydrochloridum heptahydricum

Heptahydrát emetiniumdichloridu

Synonymum. Emetini hydrochloridum heptahydricum



$C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4 \cdot 7H_2O$ M_r 679,67 CAS 79300-08-6

M_r bezvodého 553,57

Je to heptahydrát 6′,7′,10,11-tetramethoxyemetaniumdichloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *emetiniumdichloridu CRL.*

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, fluorescencí a velikostí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *peroxidu vodíku zředěného RS*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřeje se; vzniká oranžové zbarvení.

D. Asi 5 mg se nasype na povrch 1 ml *molybdenan-kyseliny sírové RS2;* vzniká světle zelené zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ nebo $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH. 4,0 až 6,0; měří se roztok připravený zředěním 4 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +16° až +19°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním množství odpovídajícího 1,250 g vysušené látky ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *emetiniumdichloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *isoemetiniumdibromidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *cefaëliniumdichloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). 1 ml porovnávacího roztoku (a), 1 ml porovnávacího roztoku (b) a 1 ml porovnávacího roztoku (c) se smíchají. Roztoky se připravují bezprostředně před použitím.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d) a 30 μl porovnávacího roztoku (e) a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *methoxyethanolu R*, *methanolu R*, *vody R* a *diethylaminu R* (100 + 20 + 5 + 2 + 0,5) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a v dobře větrané digestoři se postříká *jodem v chloroformu RS* a 15 min se suší při 60 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající isoemetinu a cefaëlinu není intenzivnější než skvrny na chromatogramech porovnávacích roztoků (b) a (c) (2,0 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících isoemetinu a cefaëlinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou tři zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 15,0 % až 19,0 %; 1,00 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 7 ml *octanu rtuťnatého RS*, 0,05 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,68 mg $C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4$.

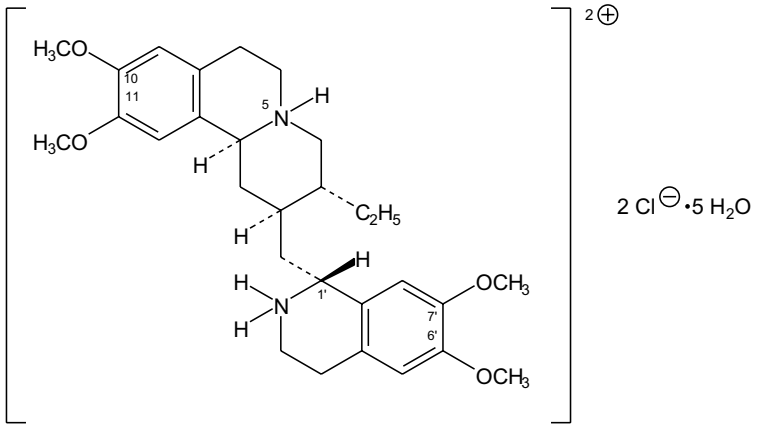
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Emetini dihydrochloridum pentahydricum

Pentahydrát emetiniumdichloridu

Synonymum. Emetini hydrochloridum pentahydricum



$C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4 \cdot 5H_2O$ M_r 643,64 CAS 79300-07-5

M_r bezvodého 553,57

Je to pentahydrát 6′,7′,10,11-tetramethoxyemetaniumdichloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *emetiniumdichloridu CRL.*

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *peroxidu vodíku zředěného RS*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřeje se; vzniká oranžové zbarvení.

D. Asi 5 mg se nasype na povrch 1 ml *molybdenan-kyseliny sírové RS2;* vzniká světle zelené zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ nebo $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH. 4,0 až 6,0; měří se roztok připravený zředěním 4 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +16° až +19°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním množství odpovídajícího 1,250 g vysušené látky ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *emetiniumdichloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (V/V) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *isoemetiniumdibromidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *cefaëliniumdichloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* a zředí se jím na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *amoniaku zředěného RS2* na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). 1 ml porovnávacího roztoku (a), 1 ml porovnávacího roztoku (b) a 1 ml porovnávacího roztoku (c) se smíchají. Roztoky se připravují bezprostředně před použitím.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl zkoušeného roztoku a porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d) a 30 μl porovnávacího roztoku (e) a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *methoxyethanolu R*, *methanolu R*, *vody R* a *diethylaminu R* (100 + 20 + 5 + 2 + 0,5) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a v dobře větrané digestoři se postříká *jodem v chloroformu RS* a 15 min se suší při 60 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající isoemetinu a cefaëlinu není intenzivnější než skvrny na chromatogramech porovnávacích roztoků (b) a (c) (2,0 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících isoemetinu a cefaëlinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou tři zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 11,0 % až 15,0 %; 1,00 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 7 ml *octanu rtuťnatého RS*, 0,05 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,68 mg $C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4$.

Uchovávání

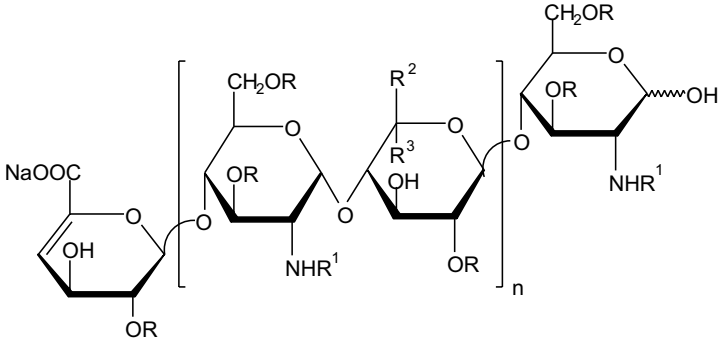
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Enoxaparinum natricum

1998

Sodná sůl enoxaparinu



n = { 1; 21}, R = H nebo SO_3Na, R^1 = H nebo SO_3Na nebo $COCH_3$

R^2 = H a R^3 = COONa nebo R^2 = COONa a R^3 = H

Je to sodná sůl nízkomolekulárního heparinu, která se získává alkalickou benzylesterovou depolymerizací heparinu z prasečí střevní sliznice. Většina složek má na neredukujícím konci svého řetězce strukturu uronatu 4-enolpyranosy.

Sodná sůl enoxaparinu vyhovuje požadavkům článku Heparina massae molecularis minoris s následujícími změnami a doplňky.

Molekulová hmotnost je v rozmezí 3500 až 5500 s průměrnou hodnotou 4500. Podíl s molekulovou hmotností nižší než 2000 je 12,0 % až 20,0 % s průměrnou hodnotou 16,0 %. Podíl s molekulovou hmotností 2000 až 8000 je 68,0 % až 88,0 % s průměrnou hodnotou 78,0 %.

Stupeň sulfatace je asi 2 na disacharidovou jednotku.

Počítáno na vysušenou látku, účinnost je 90 m.j. až 125 m.j. účinnosti anti-faktoru Xa v miligramu. Poměr účinnosti anti-faktoru Xa k účinnosti anti-faktoru IIa je 3,3 až 5,3.

Zkoušky totožnosti

Provede se zkouška totožnosti C uvedená v článku *Heparina massae molecularis minoris.*

Průměrná molekulová hmotnost a hmotnostní procenta řetězců odpovídají hodnotám uvedeným v záhlaví tohoto článku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než stupeň 5 nejpodobnějšího porovnávacího barevného roztoku *(2.2.2, Metoda II)*.

Absorbance (*2.2.25*). 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance při 231 nm. Specifická absorbance je 14,0 až 20,0, počítáno na vysušenou látku.

Benzylalkohol. Nejvýše 0,1 %. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Roztok vnitřního standardu. Připraví se roztok *3,4-dimethylfenolu R* (1 g/l) v *methanolu R*.
Zkoušený roztok. 0,500 g se rozpustí v 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a nechá se 1 h stát. Pak se přidá 1,0 ml *kyseliny octové ledové R* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok *benzylalkoholu R* ve *vodě R* (0,25 g/l). 0,50 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm) a opatřené předkolonou délky 20 mm a vnitřního průměru 4,6 mm naplněnou stejnou látkou,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (5 + 15 + 80), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 256 nm.

Z chromatogramu porovnávacího roztoku se vypočítá poměr výšky píku benzylalkoholu k výšce píku vnitřního standardu (R_1). Z chromatogramu zkoušeného roztoku se vypočítá poměr výšky píku benzylalkoholu k výšce píku vnitřního standardu (R_2).

Obsah benzylalkoholu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{0{,}0125 \ . \ R_2}{m \ . \ R_1},$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech.

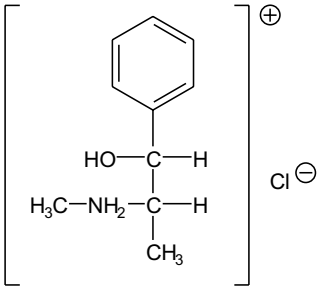
Sodík. 11,3 % až 13,5 %, počítáno na vysušenou látku. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Uchovávání

Separandum.

§ Ephedrini hydrochloridum

Efedriniumchlorid



$C_{10}H_{16}ClNO$ M_r 201,70 CAS 50-98-6

Je to (1*R*,2*S*)-(1-fenyl-1-hydroxy-2-propyl)methylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{16}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při teplotě asi 219 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *efedriniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *vody R*, 0,2 ml *síranu měďnatého RS* a 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* vznikne fialové zbarvení. Přidají se 2 ml *etheru R* a protřepe se; etherová vrstva je červeně fialová a vodná vrstva je modrá.

E. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,00 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -33,5° až -35,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se 12,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *efedriniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R, amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Skvrny světlejší než pozadí se neberou v úvahu.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,170 g se rozpustí za mírného zahřátí v 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a přidá se 50 ml *acetonu R*, 1 ml nasyceného roztoku *oranže methylové sodné soli R* v *acetonu R* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku červeného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,17 mg $C_{10}H_{16}ClNO$.

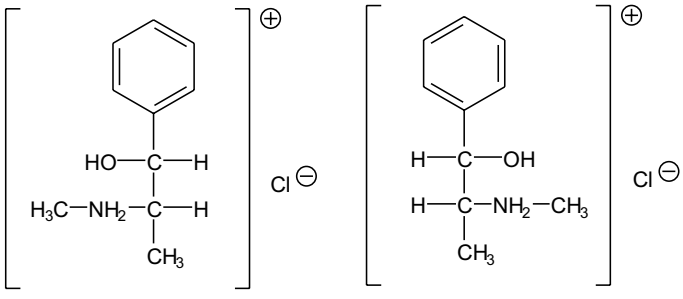
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

§ Ephedrini racemici hydrochloridum

Racemický efedriniumchlorid

Synonymum. Racephedrini hydrochloridum



$C_{10}H_{16}ClNO$ M_r 201,70 CAS 50-98-6

Je to (1*RS*,2*SR*)-(1-fenyl-1-hydroxy-2-propyl)methylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{16}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při teplotě asi 188 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem *racemického efedriniumchloridu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *vody R*, 0,2 ml *síranu měďnatého RS* a 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* vznikne fialové zbarvení. Přidají se 2 ml *etheru R* a protřepe se; etherová vrstva je červeně fialová a vodná vrstva je modrá.

E. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,00 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidá se 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +0,2° až -0,2°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *racemického efedriniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R, amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Ke skvrnám světlejším, než je pozadí, se nepřihlíží.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se zahřívá v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,170 g se rozpustí ve 30 ml *lihu 96% R*, přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* do druhého inflexního bodu. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,17 mg $C_{10}H_{16}ClNO$.

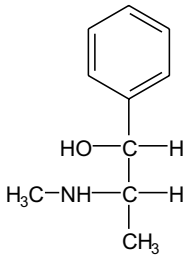
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

§ Ephedrinum

Efedrin

Synonymum. Ephedrinum anhydricum



$C_{10}H_{15}NO$ M_r 165,23 CAS 299-42-3

Je to (1*R*,2*S*)-2-methylamino-1-fenyl-1-propanol. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{15}NO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru.

Taje při teplotě asi 36 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem báze izolované z *efedriniumchloridu CRL*. Zkouší se látky v tabletách připravených následovně: 40 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, 4 ml *chloroformu R* a protřepe se. Organická vrstva se vysuší pomocí 0,2 g *síranu sodného bezvodého R;* připraví se tableta z 0,3 g *bromidu draselného R;* na tabletu se po kapkách nanese 0,1 ml organické vrstvy tak, že se rozpouštědlo nechá mezi jednotlivými naneseními odpařit; potom se tableta suší 2 min při 50 °C. Postup se opakuje s 50 mg *efedriniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 0,2 ml *síranu měďnatého RS;* vznikne fialové zbarvení. Přidají se 2 ml *etheru R* a protřepe se; etherová vrstva je červeně fialová a vodná vrstva je modrá.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -41° až -43°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,25 g v 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředěním *vodou R* na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *efedriniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R, amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Ke skvrnám světlejším, než je pozadí, se nepřihlíží.

Chloridy. 0,17 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1* a 2 min se nechá stát chráněno před přímým světlem. Opalescence roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného současně a stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*, 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1* (290 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a přidá se 20,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*. Za použití 0,05 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku žlutého zbarvení.

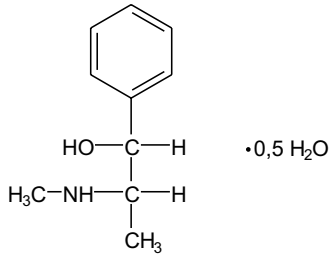
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,52 mg $C_{10}H_{15}NO$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

§ Ephedrinum hemihydricum

Hemihydrát efedrinu



$C_{10}H_{15}NO$. $0,5H_2O$ M_r 174,24 CAS 50906-05-3

Je to hemihydrát (1*R*,2*S*)-2-methylamino-1-fenyl-1-propanolu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{15}NO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru.

Taje při teplotě asi 42 °C; zkouší se nevysušená látka.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem báze izolované z *efedriniumchloridu CRL*. Zkouší se látky v tabletách připravených následovně: 40 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, 4 ml *chloroformu R* a protřepe se. Organická vrstva se vysuší pomocí 0,2 g *síranu sodného bezvodého R;* připraví se tableta z 0,3 g *bromidu draselného R;* na tabletu se po kapkách nanese 0,1 ml organické vrstvy tak, že se rozpouštědlo nechá mezi jednotlivými naneseními odpařit; potom se tableta suší 2 min při 50 °C. Postup se opakuje s 50 mg *efedriniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 10 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 0,2 ml *síranu měďnatého RS;* vznikne fialové zbarvení. Přidají se 2 ml *etheru R* a protřepe se; etherová vrstva je červeně fialová a vodná vrstva je modrá.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -41° až -43°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,25 g v 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředěním *vodou R* na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *efedriniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R, amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Ke skvrnám světlejším, než je pozadí, se nepřihlíží.

Chloridy. 0,18 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1* a 2 min se nechá stát chráněno před přímým světlem. Opalescence roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného současně a stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*, 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS1* (280 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,5 % až 5,5 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a přidá se 20,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*. Za použití 0,05 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku žlutého zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,52 mg $C_{10}H_{15}NO$.

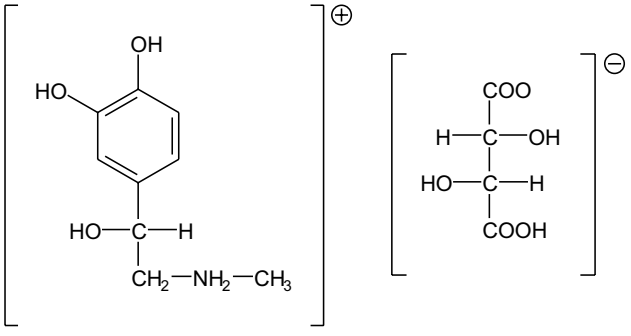
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

†† Epinephrini hydrogenotartras

Epinefriniumhydrogentartarat

Synonyma. Adrenalinium hydrogentartaricum, Adrenalini tartras, hydrogenvínan adrenalinia



$C_{13}H_{19}NO_9$ M_r 333,29 CAS 51-42-3

Je to (*R*)-2-hydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethylmethylamonium(2*R*,3*R*)-hydrogentartarat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{19}NO_9$.

Vlastnosti

Bílý až šedavě bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 2 g se rozpustí ve 20 ml roztoku *disiřičitanu sodného R* (5 g/l) a zalkalizuje se přidáním *amoniaku 17,5% R*. Chladí se 1 h ve vodě s ledem a zfiltruje se. Filtrát se použije pro zkoušku totožnosti F. Sraženina se promyje třikrát 2 ml *vody R*, 5 ml *lihu 96% R* a nakonec 5 ml *etheru R* a suší se 3 h ve vakuové sušárně. Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* sraženiny (báze epinefrinu) je -50° až -54°; měří se roztok (20,0 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 0,5 mol/l RS.*

B. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 300 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 279 nm. Specifická absorbance v maximu je 79 až 85.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety báze epinefrinu izolované ze zkoušené látky ve zkoušce totožnosti A se shoduje se spektrem tablety báze epinefrinu stejným způsobem izolované z *epinefriniumhydrogentartaratu CRL*.

D. 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*. K 1 ml roztoku se přidá 10 ml *tlumivého roztoku o pH 3,6* a 1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*. Nechá se 5 min stát a přidají se 2 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l RS;* vznikne intenzivně fialovočervené zbarvení.

E. K 1 ml roztoku připraveného pro zkoušku totožnosti D se přidá 1 ml roztoku *diethoxytetrahydrofuranu R* 1% (*V/V*) v *kyselině octové ledové R* a zahřívá se 2 min při 80 °C. Po ochlazení ve vodě s ledem se přidají 3 ml roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (20 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny octové ledové R* (1 + 19), zamíchá se a 2 min se nechá stát; roztok se zbarví žlutě, tak jako kontrolní roztok připravený stejným způsobem.

F. 0,2 ml filtrátu získaného ve zkoušce totožnosti A vyhovuje zkoušce (b) na vínany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se hodnotí okamžitě. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Adrenalon. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se stejnou kyselinou na 25,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* roztoku měřená při 310 nm není větší než 0,10.

Noradrenalin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se připraví v čas potřeby.
Porovnávací roztok (a). 12,5 mg *norepinefriniumhydrogentartaratu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se připraví v čas potřeby.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml zkoušeného roztoku se smíchají se 2 ml porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se odděleně do proužků (20 mm x 2 mm) nanese 6 µl zkoušeného vzorku, 6 µl porovnávacího roztoku (a), 6 µl porovnávacího roztoku (b) a 12 µl porovnávacího roztoku (c). Po vysušení se proužky postříkají nasyceným roztokem *hydrogenuhličitanu sodného R*. Vrstva se usuší na vzduchu a proužky se postříkají *acetanhydridem R*, usuší se a znovu se postříkají. Deska se zahřívá 90 min při 50 °C. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, acetonu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *ethylendiaminu R*, *methanolu R* a roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (5 g/l) (2 + 8 + 2). Vrstva se suší 10 min při 60 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna mezi dvěma nejintenzivnějšími skvrnami není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je patrna mezi dvěma nejintenzivnějšími skvrnami jasně oddělená skvrna odpovídající hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,00 g se suší 18 h ve vakuové sušárně.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru do vzniku modrozeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,33 mg $C_{13}H_{19}NO_9$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech nebo raději v zatavené lahvičce pod vakuem nebo pod inertním plynem, chráněn před světlem.

Venenum.

Equiseti herba

N

Přesličková nať

Synonymum. Herba equiseti

Je to usušená letní lodyha druhu *Equisetum arvense* L.

Vlastnosti

Droga téměř bez pachu a chuti. Při žvýkání vrže mezi zuby.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Lodyhy zelené, přeslenitě větvené, mělce rýhované, duté, s osmi až osmnácti hladkými nebo jen slabě drsnými žebry. Střední dutina tvoří jednu čtvrtinu až jednu třetinu průměru lodyhy. Lodyžní pochvy úzce nálevkovité, s osmi až osmnácti kopinatými, špičatými, hnědými zuby zdéli jedné třetiny až jedné poloviny pochvy, s velmi úzkým suchomázdřitým lemem. Větve jednoduché, hluboce rýhované, většinou se čtyřmi (pěti) žebry pokrytými drobnými, k vrcholu větve zahnutými křemitými hrbolky, pochvy kýlnaté zdéli zubů, zuby čtyři, široce kopinaté, většinou od větve odstálé, první článek větve vždy delší nebo zdéli příslušné lodyžní pochvy.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka z buněk podélně protáhlých, ztlustlých, se zevními stěnami inkrustovanými oxidem křemičitým. Průduchy uspořádány v širokém, několikařadém pruhu souběžném s osou článku, na dně rýhy lodyhy. Průduch tvořen dvěma páry nad sebou položených buněk. Svěrací buňky kryty jemně žebříčkovitě ztlustlými buňkami vedlejšími. Průduchy uloženy v rovině s pokožkovými buňkami, bez dýchacího dvůrku. Hypodermální sklerenchym pod žebry a lodyžními rýhami v oddělených pruzích. Chlorenchym jen pod žebry. Pod lodyžními rýhami jsou asi 300 μm velké okrouhlé nebo oválné valekulární dutiny. Kolaterální cévní svazky uložené pod žebry jsou obklopeny jednoduchou endodermis. Cévice schodovitě, kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlé. V protoxylemu každého svazku cévního je drobná karinální dutina. Střední dutina velká, nepravidelně okrouhlá. Dřeň zůstává neporušená jen v uzlinách lodyhy. Větve se liší nepřítomností střední dutiny a valekulárních dutin.

C. Práškovaná droga. Prášek je zelený až šedozelený, na omak drsný. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s charakteristickými průduchy; úlomky mezofylu s cévicemi schodovitě, kruhovitě nebo šroubovitě ztlustlými.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (710) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 1,0 mg *kyseliny kávové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *1-butanolu R* (17 + 17 + 66) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v poloze odpovídající skvrně hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku patrna intenzivně žlutooranžová až oranžovohnědá skvrna, pod ní může být patrna modrá, světle žlutá nebo žlutooranžová skvrna. V poloze odpovídající skvrně kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku je nazelenalá skvrna a nad ní dvě červené skvrny (chlorofyl).

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 % a nejvýše 1 % jiných částí matečné rostliny. V droze nejsou přítomny jarní lodyhy matečné rostliny ani jarní nebo letní lodyhy jiných druhů rodu *Equisetum* L. (zejména *Equisetum palustre* L. a *Equisetum silvaticum* L.).

Jiné druhy rodu *Equisetum* L. Na chromatogramu zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti D není v poloze vymezené skvrnami rutinu a kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku žádná fialová skvrna; žádná skvrna není ani mezi startem a polohou odpovídající skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). 15,0 % až 20,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). 4,0 % až 9,0 %.

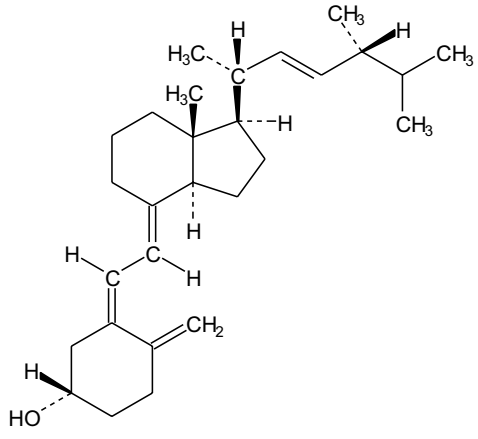
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Ergocalciferolum

Ergokalciferol

Synonyma. Calciferolum, Vitaminum D_2



$C_{28}H_{44}O$ M_r 396,65 CAS 50-14-6

Je to (5*Z*,7*E*,22*E*)-9,10-seko-5,7,10,(19),22-ergostatetraen-3β-ol. Obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{28}H_{44}O$.

1 mg odpovídá antirachitickou účinností na potkanech 40 000 m.j. vitaminu D.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek nebo bílé nebo téměř bílé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru, dobře rozpustný v mastných olejích. Vlivem vzduchu, tepla a světla se rozkládá. Roztoky v těkavých rozpouštědlech jsou nestálé, mají se připravovat v čas potřeby.

Reverzibilní izomerizace na pre-ergokalciferol v roztocích probíhá v závislosti na teplotě a čase.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 112 °C až 117 °C; stanoví se bez upráškování nebo sušení.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem *ergokalciferolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Ergosterol, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +103° až +107°; měří se roztok v 2dm trubici do 30 min připravený takto: 0,200 g se rychle a bez zahřívání rozpustí v *lihu 96% prostém aldehydů R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 50,0 mg se rychle a bez zahřívání rozpustí v *lihu 96% prostém aldehydů R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% prostým aldehydů R* na 250,0 ml. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 50,0 mg *ergokalciferolu CRL* a měří se absorbance obou roztoků v maximu při 265 nm do 30 min po přípravě roztoků. Absorbance zkoušeného roztoku se liší od absorbance porovnávacího roztoku nejvýše o 3 %. Zkoušku lze hodnotit, jestliže naměřená absorbance je 0,45 až 0,50.

Redukující látky. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% prostém aldehydů R* a zředí se jím na 10,0 ml. Přidá se 0,5 ml roztoku *modři tetrazoliové R* (5 g/l) v *lihu 96% prostém aldehydů R* a 0,5 ml *tetramethylamoniumhydroxidu zředěného RS*. Nechá se stát přesně 5 min a přidá se 1,0 ml *kyseliny octové ledové R*. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 10,0 ml roztoku obsahujícího 0,2 μg *hydrochinonu R* v 1 ml *lihu 96% prostého aldehydů R*. Měří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků při 525 nm proti kontrolnímu roztoku, kterým je 10,0 ml *lihu 96% prostého aldehydů R* zpracovaného stejným způsobem. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (2 μg/l).

Ergosterol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *dichlorethanu R*, který obsahuje *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), a zředí se stejným rozpouštědlem na 5 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *ergokalciferolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R*, který obsahuje *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), a zředí se stejným rozpouštědlem na 2 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *ergosterolu CRL* se rozpustí v *dichlorethanu R*, který obsahuje *squalan R* (10 g/l) a *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.
Porovnávací roztok (c). Smíchají se stejné objemové díly porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b). Připraví se bezprostředně před použitím.

Na vrstvu se odděleně nanese 10 μl zkoušeného roztoku, 10 μl porovnávacího roztoku (a), 10 μl porovnávacího roztoku (b) a 20 μl porovnávacího roztoku (c). Vyvíjí se ihned za ochrany před světlem směsí stejných objemových dílů *cyklohexanu R* a *etheru prostého peroxidických látek R*, která obsahuje *butylhydroxytoluen R* (0,1 g/l), po dráze 15 cm. Po usušení na vzduchu se vrstva třikrát postříká *chloridem antimonitým RS1*. Chromatogramy se hodnotí za 3 min až 4 min po postříkání. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je zpočátku oranžově žlutá a potom se zbarví hnědě. Na chromatogramu zkoušeného roztoku těsně pod hlavní skvrnou může být patrna pomalu se objevující fialová skvrna (odpovídající ergosterolu), která není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou patrny jiné skvrny, než které jsou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede co nejrychleji za ochrany před světlem a vzduchem.

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí bez zahřívání v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *ergokalciferolu CRL* se bez zahřívání rozpustí v 10,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,5 g *cholekalciferolu pro způsobilost systému CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *toluenu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml. Roztok se zahřívá 45 min ve vodní lázni při 90 °C pod zpětným chladičem a ochladí se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné vhodným silikagelem (5 μm až 10 μm),
- směsi objemových dílů *pentanolu R* a *hexanu R* (3 + 997) jako mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Automatickým dávkovačem nebo injektorovou smyčkou se nastříkne vhodný objem porovnávacího roztoku (b), zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro pík cholekalciferolu byla větší než 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Tento nástřik se provede šestkrát. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou relativní retenční časy látek: pre-cholekalciferolu 0,4, *trans*-cholekalciferolu 0,5 a cholekalciferolu 1,0. Relativní směrodatná odchylka odezvy pro cholekalciferol je nejvýše 1 % a rozlišení píku pre-cholekalciferolu a *trans*--cholekalciferolu je nejméně 1,0; je-li třeba, upraví se složení a průtoková rychlost mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo uvedeného rozlišení.

Nastříkne se vhodný objem porovnávacího roztoku (a) a zaznamená se chromatogram za použití takové citlivosti, aby odezva pro ergokalciferol byla větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Nastříkne se stejný objem zkoušeného roztoku a zaznamená se chromatogram stejným způsobem.

Obsah ergokalciferolu v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{m'}{m} \cdot \frac{S_D}{S'_D} \cdot 100,$$

v němž značí:

m - navážky zkoušené látky ve zkoušeném roztoku v miligramech,

m' - navážky *ergokalciferolu CRL* v porovnávacím roztoku (a) v miligramech,

S_D - plochu (nebo výšku) píku ergokalciferolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S'_D - plochu (nebo výšku) píku ergokalciferolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Uchovávání

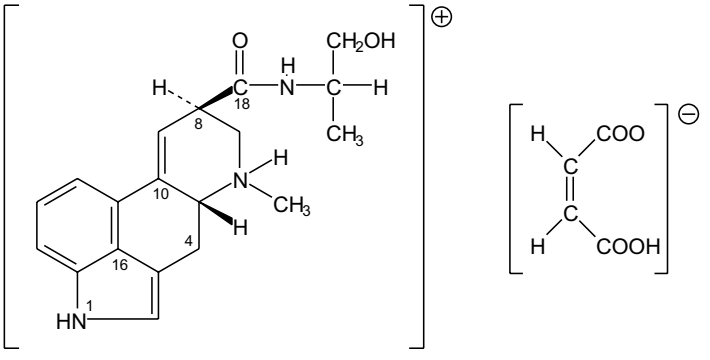
Ve vzduchotěsných obalech v atmosféře dusíku, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Obsah otevřených obalů se ihned spotřebuje.

Separandum.

†† Ergometrini hydrogenomaleas

Ergometriniumhydrogenmaleinat

Synonyma. Ergometrinium hydrogenmaleinicum, Ergometrini maleas, hydrogenmaleinan ergometrinia



$C_{23}H_{27}N_3O_6$ M_r 441,48 CAS 129-51-1

Je to (8*S*)-9,10-didehydro-N-(1-hydroxy-2-propyl)-6-methyl-8-ergoliniumkarboxamidhydrogenmaleinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{27}N_3O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě zbarvený krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 30 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml a měří se absorbance (*2.2.25*) při 250 nm až 360 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 311 nm a minimum při 265 nm až 272 nm. Specifická absorbance v maximu je 175 až 195.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ergometriniumhydrogenmaleinatu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *kyseliny octové ledové R*, 0,05 ml *chloridu železitého RS1* a 1 ml *kyseliny fosforečné R* a zahřívá se ve vodní lázni při 80 °C. Asi po 10 min vzniká modré nebo fialové zbarvení, které se stáním stává intenzivnějším.

E. 0,1 g se rozpustí ve směsi 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 2,5 ml *vody R*. Přidá se 5 ml *etheru R* a 1 ml roztoku *hydroxidu sodného koncentrovaného R* a protřepe se. Oddělí se vodná

vrstva a vytřepe se dvakrát 5 ml *etheru R*. K 0,1 ml vodné vrstvy se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; nevznikne žádné zbarvení. Ke zbytku vodné vrstvy se přidá 1 ml *bromové vody R*, zahřívá se 10 min na vodní lázni, potom se zahřeje k varu a ochladí se. K 0,2 ml tohoto roztoku se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; vzniká růžově fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,100 g se rozpustí bez zahřívání a za ochrany před světlem v 9 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ nebo $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,6 až 4,4; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* +50° až +56°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkouška se provádí co nejrychleji, za ochrany před světlem. Zkoušené roztoky a porovnávací roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok (a). 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 80% (V/V) R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 80% (V/V) R* (1 + 9) na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *ergometriniumhydrogenmaleinatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 80% (V/V) R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 80% (V/V) R* (1 + 9) na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). Ke 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) se přidají 2,0 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 80% (V/V) R* (1 + 9).

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a ihned se vyvíjí směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (3 + 25 + 75) po dráze 14 cm. Vrstva se vysuší v proudu studeného vzduchu, postříká se *dimethylaminobenzaldehydem RS7* a 2 min se suší v proudu teplého vzduchu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 0,20 g se suší 2 h nad *oxidem fosforečným R* při 80 °C a tlaku nepřevyšujícím 2,7 kPa.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,05 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,05 mol/l VS* odpovídá 22,07 mg $C_{23}H_{27}N_3O_6$.

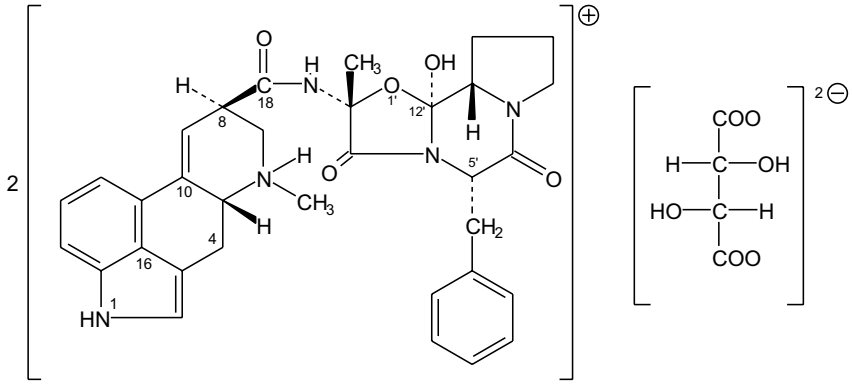
Uchovávání

Ve vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Venenum.

†† Ergotamini tartras

Ergotaminiumtartarat

Synonyma. Ergotaminium tartaricum, vínan ergotaminia



$C_{70}H_{76}N_{10}O_{16}$ M_r 1313,43 CAS 379-79-3

Je to bis[(5′*S*)-5′-benzyl-12′-hydroxy-2′-methyl-3′,6′,18-trioxoergotamonium]-(2*R*,3*R*)-tartarat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{70}H_{76}N_{10}O_{16}$. Může krystalizovat se dvěma molekulami methanolu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je slabě hygroskopický, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru. Vodné roztoky se pomalu kalí následkem hydrolýzy; tomu lze předejít přidáním kyseliny vinné.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml a měří se absorbance (*2.2.25*) při 250 nm až 360 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 311 nm až 321 nm a minimum při 265 nm až 275 nm. Specifická absorbance v maximu je 118 až 128, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ergotaminiumtartaratu CRL*. Zkoušená látka a referenční látka se rozetřou a odděleně se smíchají s 0,2 ml *methanolu R* a poté s *bromidem draselným R* způsobem popsaným v obecné stati.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky. Vrstva se pozoruje nejvýše 1 min v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou a fluorescencí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Po postřiku *dimethylaminobenzaldehydem RS7* se vrstva pozoruje v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *kyseliny octové ledové R*, 0,05 ml *chloridu železitého RS1* a 1 ml *kyseliny fosforečné R* a zahřívá se ve vodní lázni při 80 °C. Asi po 10 min vzniká modré nebo fialové zbarvení, které se stáním stává intenzivnějším.

E. Asi 10 mg se rozpustí v 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS.* Roztok se převede do dělicí nálevky a třepe se s 5 ml *chloroformu R*. Organická vrstva se odstraní a vodná vrstva se zneutralizuje několika kapkami *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* 0,1 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce (b) na vínany *(2.3.1)*. Reakční směs se nalije do 1 ml *vody R;* vzniká červené nebo hnědavě červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Zkoušky se provádějí co nejrychleji, za ochrany před světlem.

Roztok S. 30 mg se jemně rozetře s asi 15 mg *kyseliny vinné R* a rozpustí se třepáním v 6 ml *vody R.*

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH. 4,0 až 5,5; měří se suspenze připravená takto: 10 mg se jemně upráškuje a třepe se se 4 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -154° až -165°, počítáno z úhlu otočení a koncentrace ergotaminové báze. Měří se následující roztok: 0,40 g se rozpustí ve 40 ml roztoku *kyseliny vinné R* (10 g/l). Přidá se 0,5 g *hydrogenuhličitanu sodného R*, opatrně v několika dávkách, a důkladně se promíchá. Třepe se čtyřikrát s 10 ml *chloroformu R*, který byl předem promyt pětkrát 50 ml *vody R*, na 100 ml *chloroformu R*. Organické vrstvy se spojí a zfiltrují přes malý filtr zvlhčený *chloroformem R*, promytým výše popsaným postupem. Filtrát se zředí *chloroformem R*, promytým výše uvedeným postupem, na 50,0 ml. Změří se úhel otočení roviny polarizovaného světla.

Množství ergotaminové báze v chloroformovém roztoku se stanoví takto: k 25,0 ml chloroformového roztoku se přidá 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,05 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,05 mol/l VS* odpovídá 29,08 mg $C_{33}H_{35}N_5O_5$.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkoušené a porovnávací roztoky se připraví bezprostředně před použitím v dále uvedeném pořadí.*

Porovnávací roztok (a). 10 mg *ergotaminiumtartaratu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 7,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (c). Ke 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) se přidají 4,0 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9).

Zkoušený roztok (a). 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.

Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10,0 ml.

Na vrstvu se ihned odděleně nanese po 5 μl porovnávacích roztoků a potom po 5 μl zkoušených roztoků. Nanesené body se ihned exponují přesně 20 s pohybem desky ze strany na stranu nad kádinkou vysokou 55 mm a 45 mm v průměru obsahující asi 20 ml *amoniaku 26% R*. Start desky se suší přesně 20 s proudem studeného vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethanolu R*, *chloroformu R*, *dimethylformamidu R* a *etheru R* (5 + 10 + 15 + 70) po dráze 17 cm. Vrstva se suší asi 2 min v proudu studeného vzduchu a pozoruje se nejvýše 1 min v ultrafialovém světle při 365 nm pro zkoušku totožnosti. Vrstva se postříká v nadbytku *dimethylaminobenzaldehydem RS7* a asi 2 min se suší v proudu teplého vzduchu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 6,0 %; 0,100 g se suší 6 h ve vakuové sušárně při 95 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,05 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,05 mol/l VS* odpovídá 32,84 mg $C_{70}H_{76}N_{10}O_{16}$.

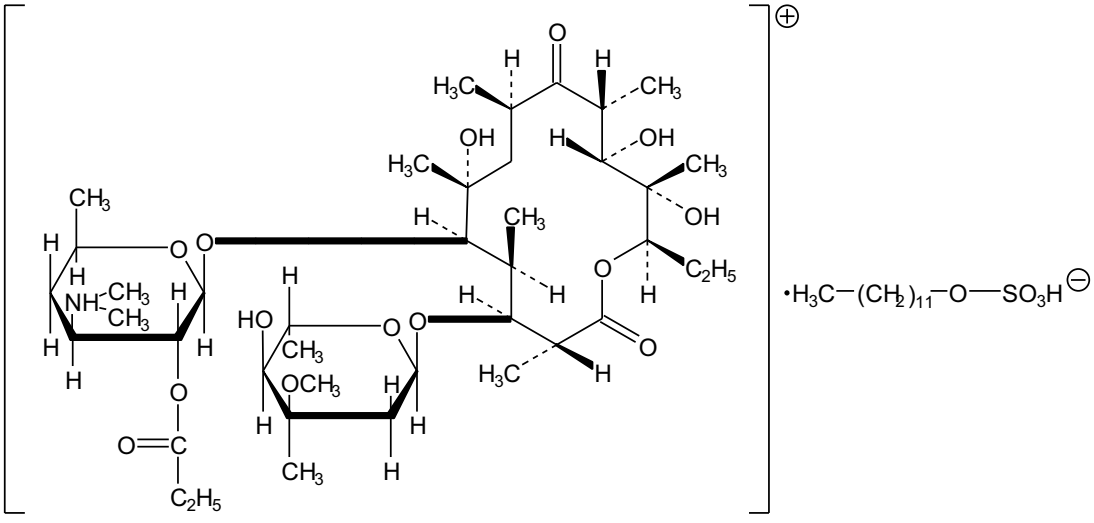
Uchovávání

Ve vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Venenum.

† Erythromycini estolas

Erythromyciniumestolat



$C_{52}H_{97}NO_{18}S$ M_r 1056,39 CAS 3521-62-8

Je to (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-4-(2,6-dideoxy-3-C-3-O-dimethyl-α-L-*ribo*-hexopyranosyloxy)-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-(3,4,6-trideoxy-3-dimethylamonio-2-O-propionyl-β-D-*xylo*-hexopyranosyloxy)-2,10-dioxo-oxacyklotetradekan-dodecylsulfat. Účinnost je nejméně 610 m.j. v miligramu, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v acetonu. Je prakticky nerozpustný ve zředěné kyselině chlorovodíkové.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *erythromyciniumestolatu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou a zbarvením hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 3 mg se suspendují ve 2 ml *kyseliny sírové zředěné R*S. Přidá se 0,1 ml roztoku *modře methylenové R* (0,1 g/l) a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se; chloroformová vrstva je modrá.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 10 min až 20 min se nechá stát; vzniká žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,0. 0,4 g se 5 min protřepává v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a nechá se ustát. Měří se pH čiré tekutiny.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 40 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *erythromyciniumestolatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *erythromyciniumestolatu CRL* a 10 mg *erythromycin-ethylsukcinatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 8 mg *erythromycinu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo předem upraveno na 7,0, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (1 + 15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká *anisaldehydem RS*. Zahřívá se 5 min na 110 °C a nechá se vychladnout. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna porovnávacího roztoku (c) (2,0 %).

Dodecylsulfat. 23,0 % až 25,5 % $C_{12}H_{26}O_4S$, počítáno na bezvodou látku. 0,500 g se rozpustí v 25 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *methoxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml roztoku *modři thymolové R* (3 g/l) v *methanolu R* jako indikátoru.

1 ml roztoku *methoxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,64 mg $C_{12}H_{26}O_4S$.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 4,0 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije roztok *imidazolu R* (100 g/l) v *methanolu bezvodém R*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 0,5 g zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

40,0 mg se rozpustí ve 40 ml *methanolu R*, přidá se 20 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Udržuje se 3 h při 60 °C a nechá se vychladnout. Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití *erythromycinu CRL* jako referenční látky.

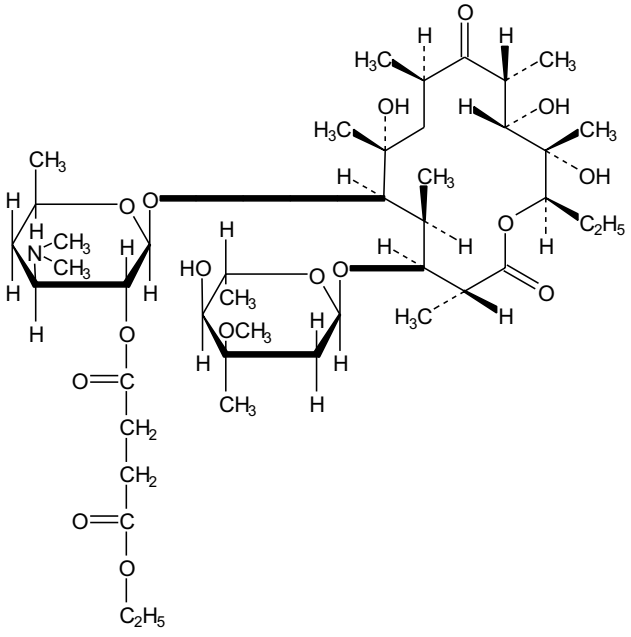
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

† Erythromycini ethylsuccinas

Erythromycin-ethylsukcinat

Synonymum. Erythromycinium ethylsuccinicum



$C_{43}H_{75}NO_{16}$ M_r 862,02 CAS 1264-62-6

Je to (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-4-(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α-L-*ribo*-hexopyranosyloxy)-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-{3,4,6-trideoxy-3-dimethylamino-2-O-[3-(ethoxycarbonyl)propionyl]-β-D-*xylo*-hexopyranosyloxy}-oxacyklotetradekan-2,10-dion.

Účinnost je nejméně 780 m.j. v miligramu, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílý krystalický hygroskopický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, ethanolu a methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *erythromycinu-ethylsukcinatu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogram získaný při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou a zbarvením hlavní

skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. K asi 5 mg se přidá 5 ml roztoku *xanthydrolu R* (0,2 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny octové R* (1 + 99) a zahřeje se na vodní lázni. Vzniká červené zbarvení.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a nechá se 10 min až 20 min stát: vzniká žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu R*. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6 (*2.2.2, Metoda II.*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 8,5; měří se suspenze 1 g ve 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -70° až -82°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v *acetonu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. Měří se nejdříve 30 min od přípravy roztoku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 40 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *erythromycin-ethylsukcinatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *erythromycin-ethylsukcinatu CRL* a 10 mg *erythromyciniumestolatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *erythromycinu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo předem upraveno na 7,0, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (1 + 15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká *anisaldehydem RS*. 5 min se zahřívá na 110 °C a nechá vychladnout. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nepřevyšuje žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5,0 %).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije roztok *imidazolu R* (100 g/l) v *methanolu bezvodém R*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

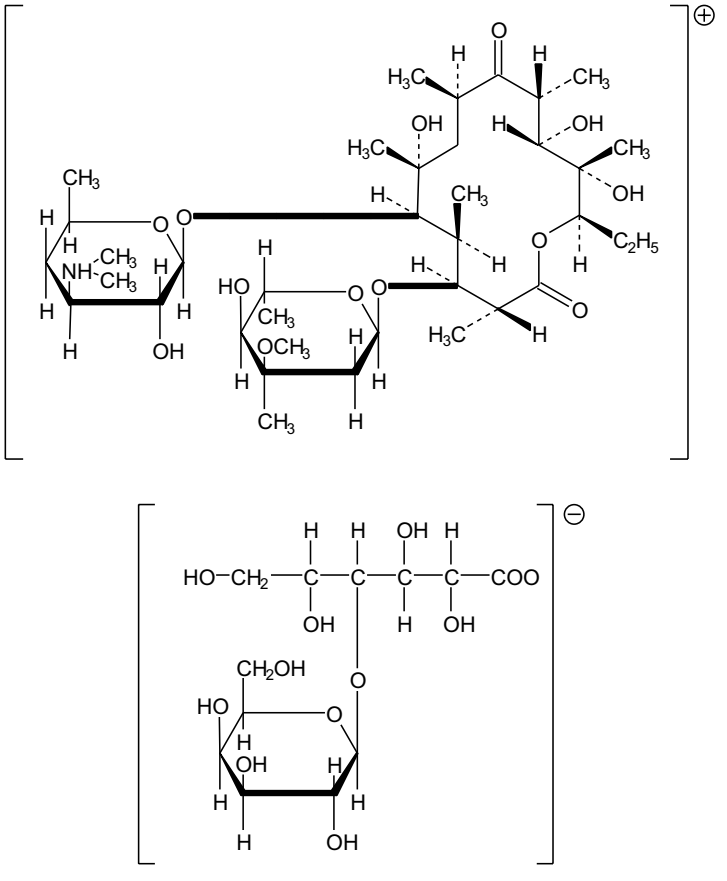
0,100 g se rozpustí ve 40 ml *methanolu R* a zředí se *tlumivým roztokem o pH 8,0* na 100,0 ml. Nechá se stát 16 h a provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití *erythromycinu CRL* jako referenční látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

† Erythromycini lactobionas

Erythromyciniumlaktobionat



$C_{49}H_{89}NO_{25}$ M_r 1092,23 CAS 3847-29-8

Je to směs laktobionatů makrolidových antibiotik. Hlavní složkou je 4-O-β-D-galaktopyranosyl--D-glukonová sůl (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-4-[(2,6-dideoxy-3-C-methyl-3-O-methyl-α--L-*ribo*-hexopyranosyl)oxy]-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-[(3,4,6-trideoxy--3-dimethylamino-β-D-xylo-hexopyranosyl)oxy]oxacyklotetradekan-2,10-dionu (erythromyciniumlaktobionat A). Počítáno na bezvodou látku, je součet obsahu erythromyciniumlaktobionatu A, erythromyciniumlaktobionatu B a erythromyciniumlaktobionatu C 93,0 % až 100,5 %.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý hygroskopický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a v methanolu, velmi těžce rozpustný v acetonu a dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 20 mg *erythromycinu A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *kyseliny laktobionové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *methanolu R* (3 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (5 g/l) v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny, z nichž jedna svou polohou, zbarvením a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a druhá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

B. K asi 5 mg se přidá 5 ml roztoku *xanthydrolu R* (0,2 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny octové R* (1 + 99); vzniká červené zbarvení.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS;* vzniká žlutavě zelené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 7,5. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Obsah erythromyciniumlaktobionatu B není větší než 5,0 % a obsah erythromyciniumlaktobionatu C není rovněž větší než 5,0 %. Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastříkne se zkoušený roztok a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času erythromycinu A. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě píku odpovídajících erythromycinu A, erythromycinu B a erythromycinu C, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (3,0 %).

Volná kyselina laktobionová. Nejvýše 1,0 % $C_{12}H_{22}O_{12}$, počítáno na bezvodou látku. 0,400 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Vypočítá se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* na gram zkoušené látky n_1 ml). 0,500 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Vypočítá se objem spotřeby *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* na gram zkoušené látky (n_2 ml). Obsah $C_{12}H_{22}O_{12}$ v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$3{,}580\ (n_1 - n_2).$$

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 5,0 %; provede se s 0,200 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije roztok *imidazolu R* (100 g/l) v *methanolu bezvodém R.*

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1 ml roztoku obsahujícího 7,4 mg zkoušené látky (odpovídá 5 mg erythromycinu) ve *vodě na injekci R*.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 60,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) a zředí se touto směsí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 40,0 mg *erythromycinu A CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) a zředí se touto směsí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *erythromycinu B CRL* a 10,0 mg *erythromycinu C CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) a zředí se touto směsí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 5 mg *N-demethylerythromycinu A CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (b). Přidá se 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se porovnávacím roztokem (b) na 25 ml.

Porovnávací roztok (d). 3,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) na 100,0 ml.

Zkoušený roztok i porovnávací roztoky se mohou používat po dobu jednoho dne, pokud se uchovávají při 5 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 µm až 10 µm) o velikosti pórů 100 nm,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2,0 ml/min připravené následujícím způsobem: k 50 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu draselného R* (35 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 9,0, se přidá 400 ml *vody R*, 165 ml *terc.butanolu R* a 30 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 215 nm,
- injektoru, 100 µl,
- elektronického integrátoru.

Kolona se udržuje při 70 °C, nejlépe za použití vodní lázně. Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška píků byla nejméně 25 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Látky se eluují v následujícím pořadí: N-demethylerythromycin A, erythromycin C, erythromycin A a erythromycin B. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že rozlišení mezi píky N-demethylerythromycinu A a erythromycinu C je nejméně 0,8 a rozlišení mezi píky N-demethylerythromycinu A a erythromycinu A je nejméně 5,5. Je-li třeba, upraví se koncentrace terc.butanolu v mobilní fázi nebo se sníží průtoková rychlost na 1,5 ml/min nebo 1,0 ml/min. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit pouze tehdy, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku erythromycinu A nejvýše 2,0 %. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztoky (a) a (b).

Obsah erythromycinu A se vypočítá v procentech za použití chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Výsledek se vyjádří jako erythromyciniumlaktobionat A vynásobením procentuálního obsahu erythromycinu A faktorem 1,4877. Obsah erythromycinu B a erythromycinu C v procentech se vypočítá za použití chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Výsledek se vyjádří jako erythromyciniumlaktobionat B a erythromyciniumlaktobionat C vynásobením faktorem 1,4877.

Uchovávání

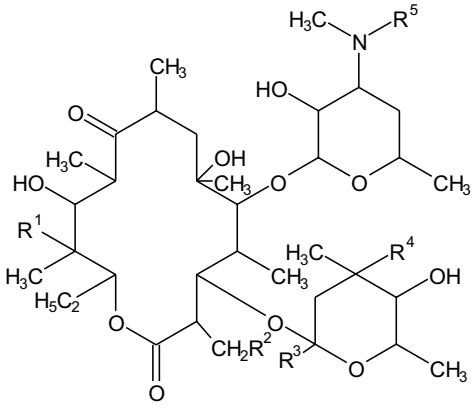
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

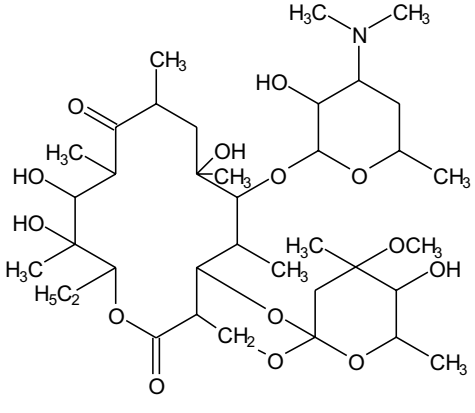
V označení se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

Nečistoty

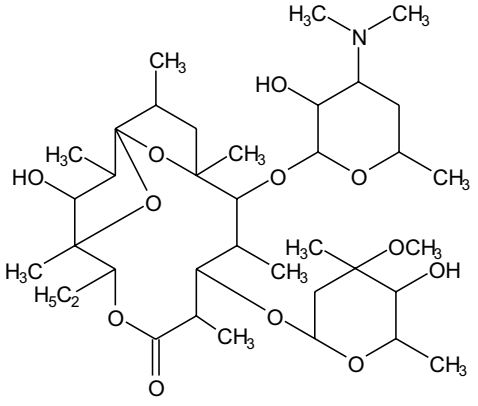


A. R^1 = OH; R^2 = OH; R^3 = H; R^4 = OCH_3; R^5 = CH_3: erythromycin F,

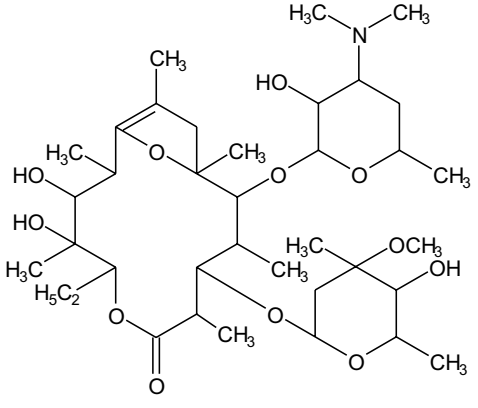
B. R^1 = OH; R^2 = H; R^3 = H; R^4 = OCH_3; R^5 = H: N-demethylerythromycin A,



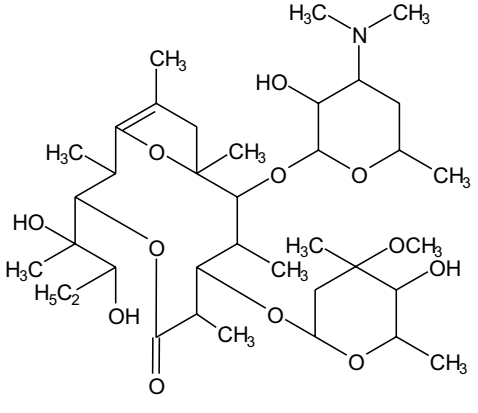
C. erythromycin E,



D. anhydroerythromycin A,



E. enolether erythromycinu A,

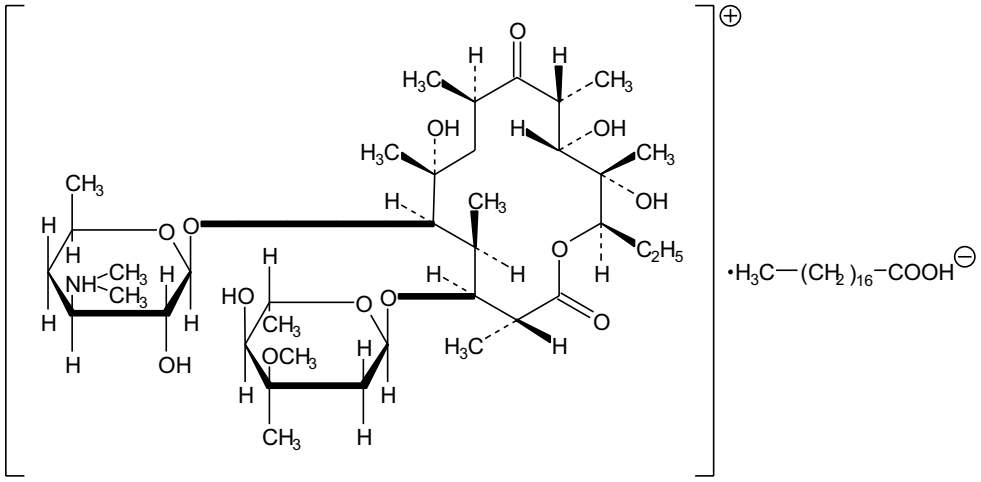


F. enolether pseudoerythromycinu A.

† Erythromycini stearas

Erythromyciniumstearat

Synonyma. Erythromycinium stearicum, stearan erythromycinia



$C_{55}H_{103}NO_{15}$ M_r 1018,42 CAS 643-22-1

Je to směs sloučeniny (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-4-(2,6-dideoxy-3-C-3-O-dimethyl- -α-L-*ribo*-hexopyranosyloxy)-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-(3,4,6-trideoxy-3-dimethylamino-2-O-propionyl-β-D-*xylo*-hexopyranosyloxy)-2,10-dioxo-oxacyklotetradekan- -stearatu produkovaného růstem určitých kmenů mikroorganismu *Streptomyces erythreus* nebo získaného jiným způsobem a kyseliny stearové.

Účinnost je nejméně 600 m.j. v miligramu, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, ethanolu a methanolu. Roztoky v těchto čtyřech rozpouštědlech mohou opalizovat.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 28 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 20 mg *erythromycinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *kyseliny stearové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku. Vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *2-propanolu R*, roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo předem upraveno *amoniakem 17,5 R* na 9,6, a *ethylacetatu R* (4 + 8 + 9) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *dichlorfluoresceinu R* (0,2 g/l) a *rhodaminu B R*

(0,1 g/l) v *lihu 96% R*. Vrstva se vystaví na několik sekund parám nad vodní lázní a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě skvrny, z nichž jedna odpovídá polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a druhá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Vrstva se postříká *anisaldehydem RS1*, zahřívá se 5 min při 110 °C a potom se pozoruje na denním světle. Barevná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

B. K asi 5 mg se přidá 5 ml roztoku *xanthydrolu R* (0,2 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny octové R* (1 + 99) a zahřívá se na vodní lázni; vzniká červené zbarvení.

C. 10 mg se suspenduje v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 10 min až 20 min se nechá stát; vzniká žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 7,0 až 10,5; měří se suspenze 1,0 g ve 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Erythromyciniumstearat. Nejméně 84,0 % $C_{55}H_{103}NO_{15}$, počítáno na bezvodou látku. 0,500 g se rozpustí v 30 ml *chloroformu R*. Opalizuje-li roztok, zfiltruje se a zbytek se třikrát vytřepe, vždy dávkou 25 ml *chloroformu R*. Pokud je třeba, zfiltruje se a filtr se promyje *chloroformem R*. Spojené filtráty a chloroform z promývání filtru se odpaří na vodní lázni na objem 30 ml. Přidá se 50 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1018 g $C_{55}H_{103}NO_{15}$.

Volná kyselina stearová. Nejvýše 14,0 % $C_{18}H_{36}O_2$, počítáno na bezvodou látku. 0,400 g se rozpustí v 50 ml *methanolu R*. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Vypočítá se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* na 1 g zkoušené látky (n_1 ml) a odečte se od něho objem spotřeby *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* na 1 g zkoušené látky ze stanovení obsahu erythromyciniumstearatu (n_2 ml).

Obsah $C_{18}H_{36}O_2$ v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$2{,}845 \ . \ (n_1 - n_2).$$

Erythromyciniumstearat a volná kyselina stearová. 98,0 % až 103,0 %, počítáno na bezvodou látku. Sečtou se hodnoty ze zkoušek Erythromyciniumstearat a Volná kyselina stearová.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 4,0 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije roztok *imidazolu R* (100 g/l) v *methanolu bezvodém R*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

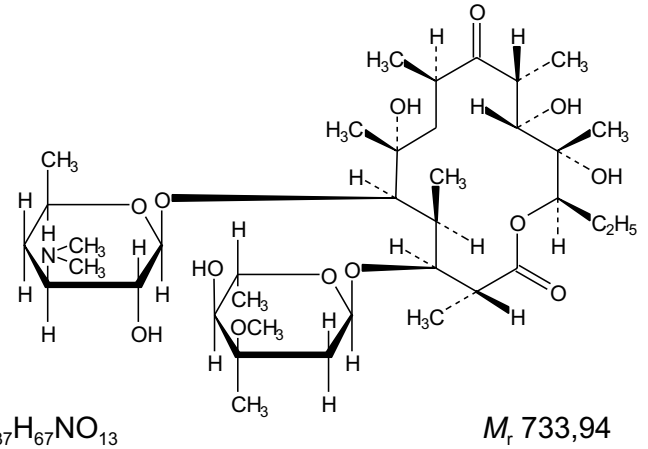
50,0 mg se rozpustí ve 100,0 ml *methanolu R* a provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití *erythromycinu CRL* jako referenční látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

† Erythromycinum

Erythromycin



$C_{37}H_{67}NO_{13}$ M_r 733,94 CAS 114-07-8

Je to směs makrolidových antibiotik produkovaných kmenem mikroorganismu *Streptomyces erythreus*. Hlavní složkou směsi je (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*R*,12*R*,13*S*,14*R*)-4-(2,6-dideoxy-3-C,3-O--dimethyl-α-L-*ribo*-hexopyranosyloxy)-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6--(3,4,6-trideoxy-3-dimethylamino-β-D-*xylo*-hexopyranosyloxy)oxacyklotetradekan-2,10-dion (erythromycin A). Celkový obsah erythromycinu A, erythromycinu B a erythromycinu C je 93,0 % až 100,5 %, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílý až slabě žlutý prášek nebo bezbarvé až slabě žluté krystalky, slabě hygroskopické. Je těžce rozpustný ve vodě (rozpustnost se snižuje se vzestupem teploty), snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v methanolu. Rozpouští se ve zředěné kyselině chlorovodíkové.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *erythromycinu A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *spiramycinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *2-propanolu R*, *ethylacetatu R* a roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo předem upraveno *amoniakem R* na 9,6, (4 + 9 + 8) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS1* a 5 min se zahřívá na 110 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a liší se polohou a zbarvením od skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

B. K asi 5 mg se přidá 5 ml roztoku *xanthydrolu R* (0,2 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny octové R* (1 + 99) a zahřeje se na vodní lázni. Vznikne červené zbarvení.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Za 10 min až 20 min vznikne žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 8,0 až 10,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 150 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -71° až -78°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Měří se nejdříve za 30 min od přípravy roztoku.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Obsah erythromycinu B není větší než 5,0 % a obsah erythromycinu C není též větší než 5,0 %. Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastříkne se zkoušený roztok a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času erythromycinu A. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě píků odpovídajících erythromycinu A, erythromycinu B a erythromycinu C, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (3,0 %).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 6,5 %; provede se s 0,200 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije roztok *imidazolu R* (100 g/l) v *methanolu bezvodém R*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 40,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) a zředí se touto směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 40,0 mg *erythromycinu A CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) a zředí se touto směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *erythromycinu B CRL* a 10,0 mg *erythromycinu C CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) a zředí se touto směsí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *N-demethylerythromycinu A CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (b). Přidá se 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se porovnávacím roztokem (b) na 25 ml.
Porovnávací roztok (d). 3,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,0* (1 + 3) na 100,0 ml.
Zkoušený roztok i porovnávací roztoky se mohou požívat po dobu jednoho dne, pokud se uchovávají při 5 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen kopolymerem R* (8 µm až 10 µm) o velikosti pórů 100 nm,

- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2,0 ml/min připravené následujícím způsobem: k 50,0 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu draselného R* (35 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 9,0, se přidá 400 ml *vody R*, 165 ml *terc.butanolu R* a 30 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 215 nm,
- injektorové smyčky, 100 μl,
- elektronického integrátoru.

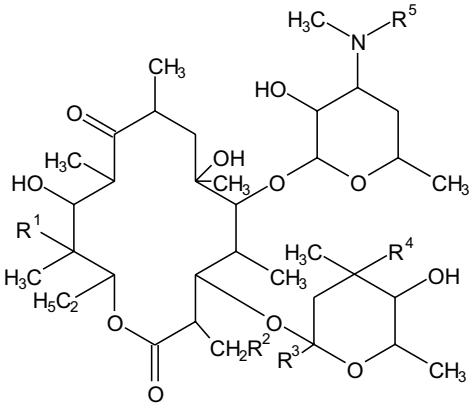
Kolona se udržuje při 70 °C, nejlépe za použití vodní lázně. Nastříkne se porovnávací roztok (c) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky píků byly nejméně 25 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Látky se eluují v následujícím pořadí: N-demethylerythromycin A, erythromycin C, erythromycin A a erythromycin B. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky N-demethylerythromycinu A a erythromycinu C je nejméně 0,8 a rozlišení mezi píky N-demethylerythromycinu A a erythromycinu A je nejméně 5,5. Je-li třeba, upraví se koncentrace terc.butanolu v mobilní fázi nebo se sníží průtoková rychlost na 1,5 ml/min nebo 1,0 ml/min. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku erythromycinu A nejvýše 2,0 %. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztoky (a) a (b).

Obsah erythromycinu A se vypočítá v procentech za použití chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Obsah erythromycinu B a C se vypočítá v procentech za použití chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Uchovávání

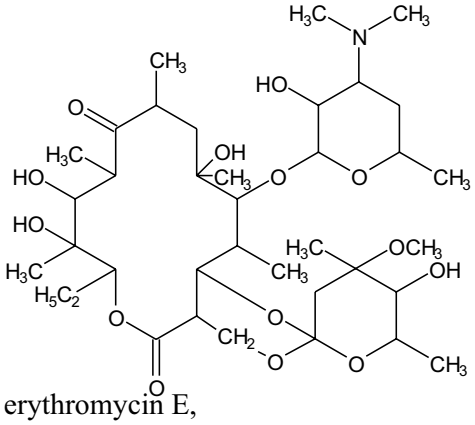
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 30 °C.
Separandum.

Nečistoty

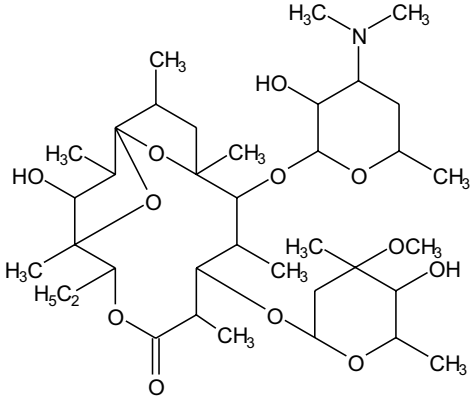


A. R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OCH_3; R_5 = CH_3: erythromycin F,

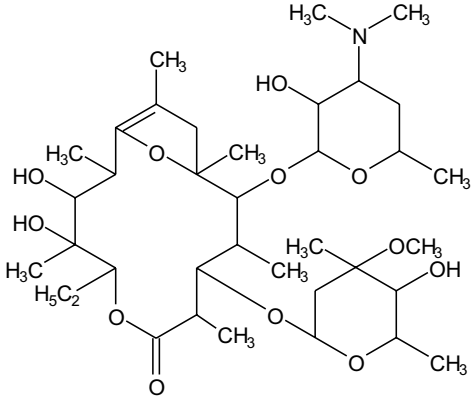
B. R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H; R_4 = OCH_3; R_5 = H: N-demethylerythromycin A,



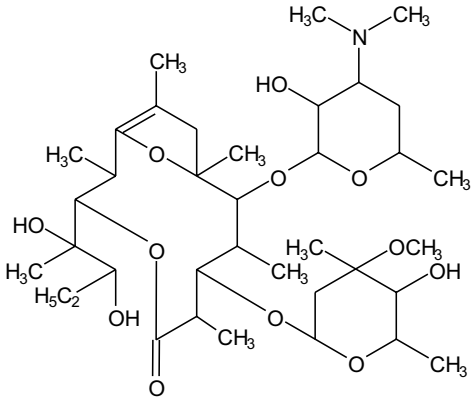
C. erythromycin E,



D. anhydroerythromycin A,



E. enolether erythromycinu A,

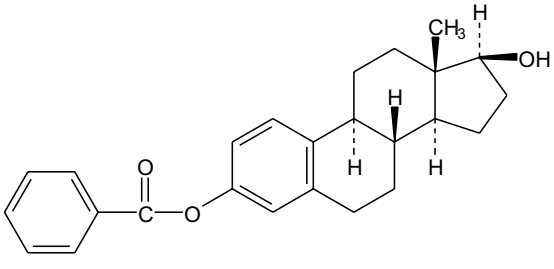


F. enolether pseudoerythromycinu A.

† Estradioli benzoas

Estradiolbenzoat

Synonymum. Estradiolum benzoicum



$C_{25}H_{28}O_3$ M_r 376,49 CAS 50-50-0

Je to 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol-3-benzoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{25}H_{28}O_3$.

Vlastnosti

Téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96% a v olejích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 191 °C až 198 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *estradiolbenzoatu CRL*. Projeví-li se rozdíly ve spektrech získaných v pevném stavu, zaznamenají se nová spektra roztoku zkoušené a roztoku referenční látky (50 g/l) v *chloroformu R*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením, fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 1 mg se přidá 0,5 ml *molybdenan-kyseliny sírové RS2;* vzniká žlutozelené zbarvení, které v ultrafialovém světle při 365 nm intenzivně zeleně fluoreskuje. Přidá se 1 ml *kyseliny sírové R* a 9 ml *vody R;* zbarvení roztoku se změní na růžové s nažloutlou fluorescencí.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +57° až +63°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *estradiolbenzoatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 25 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a zahřívá se 10 min při 110 °C. Horká vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS*, znovu se zahřívá 10 min při 110 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,50 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

25,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 250,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku v maximu při 231 nm za použití *lihu 96% R* jako kontrolní tekutiny.

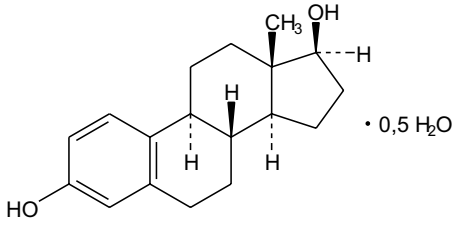
Obsah $C_{25}H_{28}O_3$ se vypočítá za použití specifické absorbance, jejíž hodnota je 500.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Estradiolum hemihydricum

Hemihydrát estradiolu



$C_{18}H_{24}O_2$. $0{,}5H_2O$ M_r 281,39 CAS 50-28-2

M_r bezvodého 272,39

Je to hemihydrát 1,3,5(10)-estratrien-3,17ß-diolu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{18}H_{24}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 175 °C až 180 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hemihydrátu estradiolu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *hemihydrátu estradiolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *ethinylestradiolu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R* a *toluenu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel, 10 min se zahřívá při 110 °C. Horká vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a znovu se zahřívá 10 min při 110 °C. Po vychladnutí se pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě skvrny, které nemusí být úplně oddělené.

D. K asi 1 mg se přidá 0,5 ml čerstvě připravené *molybdenan-kyseliny sírové RS2;* vzniká modré zbarvení, které v ultrafialovém světle při 365 nm intenzivně zeleně fluoreskuje. Přidá se 1 ml *kyseliny sírové R* a 9 ml *vody R;* zbarvení roztoku se změní na růžové s nažloutlou fluorescencí.

E. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +76° až +83°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *lihu 96% R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v 10 ml *acetonitrilu R* a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 12,5 mg *17α-estradiolu R* se rozpustí ve 20 ml *acetonitrilu R* a zředí se *methanolem R* na 50,0 ml. 25,0 mg *hemihydrátu estradiolu CRL* se rozpustí v 10 ml *acetonitrilu R*, přidá se 0,5 ml roztoku *17α-estradiolu R* a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze připravené takto: k 400 ml *acetonitrilu R* se přidá 50 ml *methanolu R* a 400 ml *vody R*, 10 min se nechá stát, zředí se *vodou R* na 1000 ml a promíchá se. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Kolona se asi 60 min ustaluje mobilní fází při průtokové rychlosti 1 ml/min.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu při nastříknutí 20 μl porovnávacího roztoku (a) činila 70 % až 90 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a při zaznamenání chromatogramů za výše popsaných podmínek retenční časy látek jsou: hemihydrátu estradiolu asi 11 min a 17α-estradiolu asi 13 min. Měří se výška *(A)* nad základní linií píku 17α-estradiolu a výška *(B)* nad základní linií nejnižšího bodu křivky dělící tento pík od píku hemihydrátu estradiolu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška *(A)* je třikrát větší než výška *(B)*. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu a vody v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku, 20 μl porovnávacího roztoku (a), 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího 17α-estradiolu (bezprostředně následuje za hlavním píkem) není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); plocha žádného jiného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); součet ploch všech vedlejších píků (včetně píku 17α-estradiolu) není větší než 0,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). K žádnému píku rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,01násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a), se nepřihlíží.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 2,9 % až 3,5 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

20,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238 nm.

Vypočítá se obsah $C_{18}H_{24}O_2$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 335.

Uchovávání

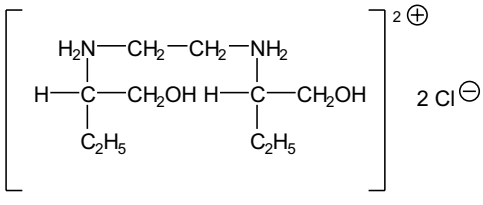
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Ethambutoli hydrochloridum

Ethambutoliumdichlorid

Synonyma. Ethambutolium dichloratum, chlorid ethambutolia



$C_{10}H_{26}Cl_2N_2O_2$ M_r 277,23 CAS 1070-11-7

Je to N,N′-bis(1-hydroxy-2-butyl)ethylendiamoniumdichlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{26}Cl_2N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Taje při teplotě asi 202 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ethambutoliumdichloridu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce 2-Aminobutanol, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 0,2 ml *síranu měďnatého RS*. Po přidání 0,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se roztok zbarví modře.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,7 až 4,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,2 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

2-Aminobutanol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GR*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *2-aminobutanolu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *ethambutoliumdichloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *methanolu R* (10 + 15 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, zahřívá se 10 min při 110 °C, po ochlazení se postříká *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 5 min při 110 °C. Skvrna odpovídající 2-aminobutanolu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 70 ml *amoniaku zředěného RS2* se přidají 4,0 ml *síranu měďnatého RS*, promíchá se, přidá se 5,0 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml. 0,100 g zkoušené látky se rozpustí ve 20 ml takto připraveného roztoku a zředí se jím na 25,0 ml. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 0,100 g *ethambutoliumdichloridu CRL*. Měří se optická otáčivost (*2.2.7*) obou roztoků při 436 nm.

Obsah $C_{10}H_{26}Cl_2N_2O_2$ se vypočítá z naměřených optických otáčivostí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

Ether anestheticus

Ether k narkóze

Synonyma. Aether pro narcosi, Aether anaestheticus

C_2H_5-O-C_2H_5

$C_4H_{10}O$ M_r 74,12 CAS 60-29-7

Je to diethylether, který může obsahovat vhodnou netěkavou antioxidační přísadu v přiměřené koncentraci.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá těkavá kapalina, velmi pohyblivá, snadno zápalná. Rozpouští se v 15 dílech vody, je mísitelný s lihem 96% a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Destilační rozmezí, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,714 až 0,716.

Destilační rozmezí *(2.2.11). Pokud zkoušená látka nevyhověla zkoušce Peroxidické látky, zkouška se neprovádí.*

Zkoušená látka úplně předestiluje v rozmezí 34,0 °C až 35,0 °C. Zkouška se provede za použití vhodného zahřívání a tak, aby nedošlo k přímému zahřívání baňky nad hladinou kapaliny.

Netěkavé látky. *Zkouška se provede u zkoušené látky, u níž bylo zjištěno, že vyhovuje zkoušce na peroxidy.*

50 ml se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se suší při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 1 mg (20 μg/ml).

Látky s cizím pachem. Na filtrační papír o průměru 80 mm se nakape 5 ml zkoušené látky a nechá se odpařit. Ihned po odpaření není znatelný cizí pach.

Volné kyseliny. Ke 20 ml *lihu 96% R* se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1* a po kapkách *hydroxid sodný 0,02 mol/l VS* do vzniku modrého zbarvení stálého 30 s. K tomuto roztoku se přidá 25 ml zkoušené látky, protřepe se a přidává se po kapkách *hydroxid sodný 0,02 mol/l VS* do vzniku modrého zbarvení stálého 30 s. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* je nejvýše 0,4 ml.

Aceton a aldehydy. K 10,0 ml v odměrném válečku se zabroušenou zátkou se přidá 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* a 10 s se protřepává. Směs se nechá 5 min stát chráněna před světlem; spodní vrstva může vykazovat pouze slabou opalescenci.

Nevyhoví-li zkoušená látka této zkoušce, postupuje se takto: *Po ověření, že zkoušená látka vyhovuje zkoušce na peroxidické látky,* se 40 ml zkoušené látky destiluje tak, aby zůstal zbytek pouze 5 ml. Destilát se jímá do předlohy chlazené vodou s ledem a zkouška se opakuje s 10,0 ml destilátu.

Peroxidické látky. Odměrný váleček se zabroušenou zátkou na 12 ml o průměru 15 mm obsahující 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS* se zcela naplní zkoušenou látkou, promíchá se a nechá se 30 min stát chráněn před světlem; roztok se nezbarví.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2 g/l; stanoví se s 20,0 ml zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C. Obsahy částečně naplněných obalů se mohou rychle znehodnotit.

Označování

V označení na obalu se uvede název a množství přítomného netěkavého antioxidantu, pokud byl přidán.

Ether solvens

Ether

Synonymum. Aether

H_5C_2-O-C_2H_5

$C_4H_{10}O$ M_r 74,12 CAS 60-29-7

Je to diethylether, který může obsahovat vhodnou netěkavou antioxidační přísadu v přiměřené koncentraci.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá těkavá kapalina, snadno zápalná. Je dobře rozpustný ve vodě, je mísitelný s lihem 96%, s dichlormethanem a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Destilační rozmezí, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Volné kyseliny. Ke 20 ml *lihu 96% R* se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1* a po kapkách *hydroxid sodný 0,02 mol/l VS* do vzniku modrého zbarvení stálého 30 s. K tomuto roztoku se přidá 25 ml zkoušené látky, protřepe se a přidává se po kapkách *hydroxid sodný 0,02 mol/l VS* do vzniku modrého zbarvení stálého 30 s. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* je nejvýše 0,4 ml.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,714 až 0,716.

Destilační rozmezí *(2.2.11)*. *Zkouška se provede u zkoušené látky, u níž bylo zjištěno, že vyhovuje zkoušce Peroxidické látky.*

Zkoušená látka úplně předestiluje v rozmezí 34,0 °C až 35,0 °C. Zkouška se provede za použití vhodného zahřívání a tak, aby nedošlo k přímému zahřívání baňky nad hladinou kapaliny.

Netěkavé látky. *Pokud zkoušená látka nevyhověla zkoušce Peroxidické látky, zkouška se neprovádí.*

50 ml se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se vysuší v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 1 mg (20 mg/l).

Látky s cizím pachem. Filtrační papír o průměru 80 mm se navlhčí 5 ml zkoušené látky a nechá se odpařit. Ihned po odpaření není znatelný cizí pach.

Aldehydy. K 10,0 ml v odměrném válečku se zabroušenou zátkou se přidá 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* a 10 s se protřepává. Směs se nechá 5 min stát chráněna před světlem; spodní vrstva může opalizovat žlutě nebo červenavě hnědě, nikoliv šedě nebo černě.

Peroxidické látky. Odměrný váleček se zabroušenou zátkou na 12 ml o průměru 15 mm obsahující 8 ml *škrobu s jodidem draselným RS* se zcela naplní zkoušenou látkou, promíchá se a nechá se 5 min stát chráněn před světlem; roztok se nezbarví.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2 g/l; stanoví se s 20,0 ml zkoušené látky.

Uchovávání

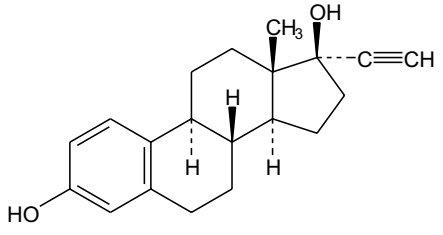
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede název a množství přítomného netěkavého antioxidantu, pokud byl přidán.

† Ethinylestradiolum

Ethinylestradiol



$C_{20}H_{24}O_2$ M_r 296,41 CAS 57-63-6

Je to 19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{24}O_2$.

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 181 °C až 185 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ethinylestradiolu CRL*. Projeví-li se rozdíly ve spektrech získaných v pevném stavu, zaznamenávají se nová spektra roztoku zkoušené látky a roztoku referenční látky (30 g/l) v *chloroformu R.*

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou, zbarvením, fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 1 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny sírové R;* vzniká oranžově červené zbarvení, které v ultrafialovém světle při 365 nm zelenavě fluoreskuje. Přidá se 10 ml *vody R;* zbarvení se mění na fialové a vzniká fialová sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -27° až -30°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g v *pyridinu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 0,10 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml; absorpční maximum roztoku je při 281 nm. Specifická absorbance v maximu je 69 až 73.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *ethinylestradiolu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se jí na 25 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *estronu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a pak se zahřívá 10 min při teplotě 110 °C. Horká vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS*. Pak se vrstva opět zahřívá 10 min při 110 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není skvrna odpovídající estronu intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající estronu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 40 ml *tetrahydrofuranu R,* přidá se 5 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Současně se provede slepá zkouška.

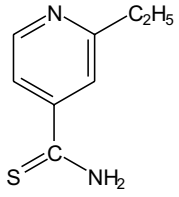
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,64 mg sloučeniny $C_{20}H_{24}O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Ethionamidum

Ethionamid



$C_8H_{10}N_2S$ M_r 166,24 CAS 536-33-4

Je to 2-ethylpyridin-4-karbothiamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{10}N_2S$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek nebo malé žluté krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 158 °C až 164 °C.

B. 10,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; absorpční maximum je při 290 nm. Specifická absorbance v maximu je 380 až 440.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ethionamidu CRL*.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *dusičnanu stříbrného RS2;* vznikne tmavě hnědá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí zahřátím asi na 50 °C v 10 ml *methanolu R* a nechá se ochladit na pokojovou teplotu. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Kysele reagující látky. 2,0 g se rozpustí zahřátím asi na 50 °C v 20 ml *methanolu R*, přidá se 20 ml *vody R*. Mírně se ochladí za protřepávání, až se začnou objevovat krystalky, a pak se nechá ochladit na pokojovou teplotu. Přidá se 60 ml *vody R* a 0,2 ml *červeně kresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,2 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

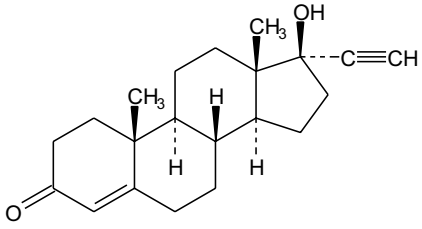
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,62 mg sloučeniny $C_8H_{10}N_2S$.

Uchovávání

Separandum.

† Ethisteronum

Ethisteron



$C_{21}H_{28}O_2$ M_r 312,45 CAS 434-03-7

Je to 17-hydroxy-17α-pregn-4-en-20-in-3-on. Počítáno na látku předepsaným způsobem vysušenou, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{28}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v pyridinu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Taje za slabého rozkladu při asi 274 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ethisteronu CRL*. Pokud jsou získaná spektra v tuhém stavu rozdílná, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *chloroformu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a se získanými zbytky se zaznamenají nová spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *křemeliny G R*. Vrstva se impregnuje v chromatografické komoře obsahující takové množství směsi objemových dílů *acetonu R* a *formamidu R* (90 + 10), aby asi 5 mm desky bylo ponořeno do této směsi. Když čelo impregnační směsi dosáhne nejméně 1 cm nad vzdálenost předepsanou pro vyvíjení mobilní fází, deska se vyjme a ponechá volně při pokojové teplotě, dokud se rozpouštědlo zcela neodpaří (asi 2 min až 5 min). Impregnovaná vrstva se použije do dvou hodin po impregnaci a vyvíjení se provádí ve stejném směru jako impregnace.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *ethisteronu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *hexanu R* a *dioxanu R* (80 + 20) po dráze 15 cm. Vrstva se zahřívá 15 min při 120 °C, postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS* a znovu se zahřívá 10 min až 15 min při 120 °C do objevení skvrn. Vrstva se nechá ochladit a pozoruje se v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou, zbarvením, fluorescencí a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*. Přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a zahřívá se na vodní lázni; roztok se zakalí, vznikne bílá sraženina, která při zahřívání šedne. Na stěnách zkumavky se tvoří stříbrné zrcátko.

D. Asi 2 mg se rozpustí v ochlazené směsi 2 ml *ethanolu R* a 2 ml *kyseliny sírové R* a roztok se zahřeje na 70 °C. Výsledný roztok je dichroický, v procházejícím světle je modrofialový, v odraženém světle je červený. V ultrafialovém světle při 365 nm roztok vykazuje jasně červenou fluorescenci.

E. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*. Přidá se 1 ml roztoku *butylhydroxytoluenu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* a 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS,* zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 80 °C a ochladí se na pokojovou teplotu; vzniká intenzivní modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +29° až +33°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *pyridinu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml. Roztok vykazuje maximum při 240 nm; specifická absorbance v maximu je 500 až 540, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 3) na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl a 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS*. Potom se zahřívá 15 min při 120 °C a pozoruje se v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,2000 g se rozpustí ve 40 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 10 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *zeleně bromkresolové RS* jako indikátoru do fialového zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

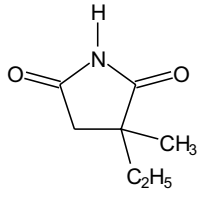
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,25 mg sloučeniny $C_{21}H_{28}O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Ethosuximidum

Ethosuximid



$C_7H_{11}NO_2$ M_r 141,17 CAS 77-67-8

Je to (*RS*)-3-ethyl-3-methyl-2,5-pyrrolidindion. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_{11}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo vosková hmota. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, v etheru a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 45 °C až 50 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. Změří se absorbance při 230 nm až 300 nm *(2.2.25)*; absorpční maximum roztoku je při 248 nm. Specifická absorbance v maximu je 8 až 9.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ethosuximidu CRL*. Roztaví se dostatečné množství látky při 50 °C a připraví se z ní film mezi dva nahřáté výlisky *bromidu draselného R*. Bezprostředně potom se zaznamená spektrum.

D. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *methanolu R*. K roztoku se postupně přidá 0,05 ml roztoku *chloridu kobaltnatého R* (100 g/l), 0,05 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (100 g/l) a 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vzniká fialově červené zbarvení a nevzniká sraženina.

E. Asi k 10 mg se přidá 10 mg *resorcinolu R* a 0,2 ml *kyseliny sírové R*. Směs se zahřívá 5 min při 140 °C. Po ochlazení se přidá 5 ml *vody R* a 2 ml *amoniaku 32% R;* vznikne hnědé zbarvení. Přidá se asi 100 ml *vody R;* roztok zeleně fluoreskuje.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kyanidy. 1,0 g se rozpustí v 10,0 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,5 ml *síranu železnatého RS2*, 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,1 ml *chloridu železitého RS1*. Roztok se zahřeje k varu, ochladí se a okyselí se 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Po 15 min nevznikne modré zbarvení ani modrá sraženina.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *antracenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 10 mg *anthracenu R* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,00 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem vnitřního standardu na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *kyseliny 2-ethyl-2-methyljantarové R* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *chloroformem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *chloroformem R* na 50,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) a 5,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *chloroformem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provede za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (150 μm až 200 μm), impregnovanou 3 % *poly(kyanopropyl)(methylfenylmethyl)siloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 165 °C, teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 240 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku (c) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky třech píků, kromě píku rozpouštědla, činily nejméně 70 % celé stupnice zapisovače.

Látky se eluují v následujícím pořadí: kyselina 2-ethyl-2-methyljantarová, ethosuximid a anthracen. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky kyseliny 2-ethyl-2-methyljantarové a ethosuximidu je nejméně 4.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku (a). Na získaném chromatogramu se ověří, že není přítomen žádný pík s retenčním časem shodným s retenčním časem píku vnitřního standardu.

Odděleně se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku (b) a 1 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času píku ethosuximidu. Z chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se vypočte poměr *(R)* plochy píku ethosuximidu k ploše píku vnitřního standardu. Z chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se vypočítá poměr součtu ploch píků, kromě plochy hlavního píku, píku vnitřního standardu a píku rozpouštědla, k ploše píku vnitřního standardu: tento poměr není větší než *R* (0,1 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 20 ml *dimethylformamidu R* se přidá 0,2 ml roztoku *thymolftaleinu R* (5 g/l) v *dimethylformamidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* do vzniku zřetelně modrého zbarvení. Bezprostředně potom se přidá 0,120 g zkoušené látky a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* do opětovného vzniku zřetelně modrého zbarvení. Titrovaný roztok je třeba během titrace chránit před vlivem atmosférického oxidu uhličitého.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* spotřebovaného při druhé titraci odpovídá 14,12 mg $C_7H_{11}NO_2$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. kyselina 2-ethyl-2-methyljantarová.

Ethylcellulosum

Ethylcelulosa

1998

CAS 9004-57-3

Je to částečně O-ethylovaná celulosa. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 44,0 % až 51,0 % ethoxy ($-OC_2H_5$) skupin.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý prášek nebo granulovaný prášek, bez pachu nebo téměř bez pachu. Je prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v dichlormethanu a ve směsi 20 g lihu 96% a 80 g toluenu, těžce rozpustná v ethylacetatu a v methanolu, prakticky nerozpustná v glycerolu (85%) a v propylenglykolu. Roztoky mohou slabě opalizovat.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. ethylcelulosy*.

B. 0,2 g se nerozpustí v 10 ml *vody R*, ale rozpustí se v 10 ml *toluenu R* za vzniku slabě opalizujícího roztoku.

C. Rozmezí pro Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 0,5 g se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R,* protřepává se 15 min a zfiltruje se filtrem ze slinutého skla (40). K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je růžový. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Viskozita *(2.2.9)*. Množství odpovídající 5,00 g vysušené látky se protřepává s 95 g směsi 20 g *lihu 96% R* a 80 g *toluenu R*, až se látka rozpustí. Viskozita se stanoví za použití kapilárního viskozimetru. Viskozita stanovená při 25 °C a vyjádřená v milipascalsekundách je 90 % až 110 % hodnoty uvedené v označení pro nominální hodnotu 10 mPa.s nebo vyšší; 80 % až 120 % hodnoty uvedené v označení pro nominální hodnotu nižší než 10 mPa.s, ale nejméně 6 mPa.s; 75 % až 140 % hodnoty uvedené v označení pro nominální hodnotu 6 mPa.s nebo nižší.

Acetaldehyd. Do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou se odváží 3,0 g, přidá se 10 ml *vody R* a mechanicky se 1 h míchá. Nechá se stát 24 h, zfiltruje se a filtrát se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se převede do 25ml odměrné baňky, přidá se 5 ml roztoku *methylbenzothiazolonhydrazonhydrochloridu R* (0,5 g/l) a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C. Přidají se 2 ml *zkoumadla chlorid železitý-kyselina amidosírová R* a znovu se zahřívá 5 min ve vodní lázni při 60 °C. Ochladí se a zředí se *vodou R* na 25,0 ml. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 5,0 ml roztoku (místo 5,0 ml filtrátu) připraveného zředěním 3,0 ml základního *roztoku acetaldehydu (100 μg C_2H_4O/ml)* vodou (1) na 100,0 ml (100 μg/g).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,250 g se disperguje v 50 ml *vody R*, zahřeje se k varu, nechá se zchladnout za občasného protřepání. Zfiltruje se a prvních 10 ml filtrátu se odstraní. 10 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml; takto upravený vzorek vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8).* 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 120 μl *toluenu R* se zředí *o-xylenem R* na 10 ml.

Varování. *Kyselina jodovodíková a její reakční produkty jsou vysoce toxické. Všechny kroky přípravy zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku se provádějí za příslušných ochranných opatření.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg zkoušené látky, 50,0 mg *kyseliny adipové R* a 2,0 ml roztoku vnitřního standardu se přenesou do vhodné 5ml silnostěnné reakční lahvičky s pertlovacím těsnícím uzávěrem. Opatrně se přidají 2,0 ml *kyseliny jodovodíkové R*, lahvička se okamžitě těsně uzavře a přesně se i s obsahem zváží. Lahvičkou se 30 s třepe, 10 min se zahřívá při 125 °C, 2 min se nechá chladnout, znovu se 30 s třepe a 10 min se zahřívá při 125 °C. Potom se znovu 2 min nechá chladnout a třepání a zahřívání se po třetí opakuje. Lahvička se 45 min nechá chladit a znovu se zváží. Jestliže ztráta hmotnosti je větší než 10 mg, směs se odstraní a připraví se jiná. Použije se horní vrstva.

Porovnávací roztok. 100,0 mg *kyseliny adipové R,* 4,0 ml roztoku vnitřního standardu a 4,0 ml *kyseliny jodovodíkové R* se přenesou do vhodné 10ml silnostěnné lahvičky s pertlovacím těsnícím uzávěrem. Lahvička se uzavře a přesně se i s obsahem zváží. Potom se injekční stříkačkou vstříkne do lahvičky přes zátku 50 μl *jodethanu R,* lahvička se znovu zváží a z rozdílu hmotností se vypočítá hmotnost přidaného jodethanu. Dobře se protřepe a nechají se oddělit vrstvy.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 5,0 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* (150 μm až 180 μm) impregnovanou 3 % *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 15 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 200 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl horní vrstvy zkoušeného roztoku a horní vrstvy porovnávacího roztoku.

Relativní retenční časy látek jsou: jodethanu 0,6, toluenu 1,0 a o-xylenu 2,3. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky dvou hlavních píků nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky jodethanu a toluenu je nejméně 2,0.

Vypočítá se obsah jodethanu v procentech podle vzorce:

$$\frac{Q_1 \,.\, m_2 \,.\, 45{,}1 \,.\, 100 \,.\, 100}{2 \,.\, Q_2 \,.\, m_1 \,.\, 156{,}0 \,.\, (100 - d)},$$

v němž značí:

Q_1 - poměr plochy píku jodethanu k ploše píku toluenu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
Q_2 - poměr plochy píku jodethanu k ploše píku toluenu na chromatogramu porovnávacího roztoku,
m_1 - navážku zkoušené látky ve zkoušeném roztoku v miligramech,
m_2 - navážku jodethanu v porovnávacím roztoku v miligramech,
d - ztrátu sušením v procentech.

Uchovávání

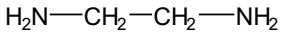
V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede nominální viskozita 5% roztoku v milipascalsekundách.

Ethylendiaminum

Ethylendiamin



$C_2H_8N_2$ M_r 60,10 CAS 107-15-3

Je to 1,2-ethandiamin. Obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_2H_8N_2$.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá hygroskopická kapalina. Je mísitelný s vodou a s ethanolem, těžce rozpustný v etheru. Při styku se vzduchem se uvolňují bílé páry. Při zahřívání dochází k úplnému odpaření.

Zkoušky totožnosti

A. Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,895 až 0,905.

B. Teplota varu *(2.2.12)*. 116 °C až 118 °C.

C. K 0,2 ml se přidá 0,5 ml *acetanhydridu R* a povaří se. Po ochlazení vznikne krystalická hmota, která se rozpustí zahřátím v 5 ml *2-propanolu R*. Roztok se ochladí a přidá se 5 ml *etheru R*. V případě potřeby se krystalizace vyvolá třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky. Roztok se zfiltruje filtrem ze slinutého skla, promyje se několikrát *etherem R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek taje *(2.2.14)* při 173 °C až 177 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 g se smíchá s *vodou prostou oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Uhličitany. Směs 4 ml roztoku S a 6 ml *hydroxidu vápenatého RS* neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Chloridy *(2.4.4)*. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Amonium a jiné báze. 1,2 g se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* a přidá se po kapkách za stálého míchání 4,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se odpaří do sucha na vodní lázni, zbytek se rozdrtí skleněnou tyčinkou a suší se 1 h při 100 °C až 105 °C.

1 g zbytku odpovídá 0,4518 g $C_2H_8N_2$. Nalezený procentuální obsah $C_2H_8N_2$ se neliší od nalezeného procentuálního obsahu ve Stanovení obsahu o více než 0,5 %.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Zbytek po odpaření. 5,00 g se odpaří do sucha na vodní lázni a suší se 1 h při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 15 mg (0,3 %).

Stanovení obsahu

25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a 0,2 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* se smíchá v baňce a přidá se 0,600 g zkoušené látky. Titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do změny fialově červeného zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 30,05 mg $C_2H_8N_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Ethylenglycoli monostearas

Ethylenglykolmonostearat

CAS 111-60-4

Je to směs ethylenglykolmono- a diesterů kyseliny stearové a palmitové. Obsahuje nejméně 50 % monoesterů připravených kondenzací ethylenglykolu a kyseliny stearové.

Výroba

Je-li ethylenglykolmonostearat vyráběn z loje, musí zvířata, ze kterých je lůj získáván, splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro humánní konzumaci. Pokud jsou pro výrobu použity tkáně bovinního původu, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl by být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí tkáně, jež se má použít, se má vzít v úvahu relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské unie Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosu původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá voskovitá tuhá látka. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v horkém lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Teplota tání, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. K 2,5 g se přidá 40 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Přidá se 30 ml *vody R*, oddestiluje se líh, k horké směsi se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, ochladí se a protřepe se s 50 ml *etheru R*. Horní vrstva se promyje třikrát 10 ml *chloridu sodného RS*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se vysuší za sníženého tlaku.

K 0,1 g zbytku v baňce se přidá 5 ml roztoku *fluoridu boritého R* (140 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se 15 min pod zpětným chladičem. Ochladí se a převede se do dělicí nálevky s 10 ml *hexanu R*. Přidá se 10 ml nasyceného roztoku *chloridu sodného R* a 10 ml *vody R*. Protřepe se, spodní vrstva se odstraní a horní vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R*.

Porovnávací roztok. 0,25 g *methylpalmitatu R* a 0,25 g *methylstearatu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro chromatografii R* (100 μm až 115 μm), impregnovanou *polyethylenglykolsukcinatem R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 170 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je 220 °C. Nastříkne se 1 μl každého roztoku. Retenční časy a velikosti dvou hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přibližně shodné s retenčními časy a velikostmi hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Zkouška Stanovení obsahu (obsah monoesterů) je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Teplota tání *(2.2.15)*. 54 °C až 60 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 3,0 (I_A); stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 3,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 170 až 195; stanoví se s 2,0 g zkoušené látky.

Volný ethylenglykol. Nejvýše 5,0 %; stanoví se postupem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se obsah volného ethylenglykolu a monoesterů vylučovací chromatografií *(2.2.30)*.

Zkoušený roztok. Do 15ml baňky se naváží asi 0,2 g (m_1) s přesností na 0,1 mg. Přidá se 5 ml *tetrahydrofuranu R* a třepe se do rozpuštění, je-li třeba, mírně se zahřeje. Baňka se znovu zváží a vypočítá se celková hmotnost rozpouštědla a zkoušené látky (m_2).

Porovnávací roztoky. Do čtyř 15ml baněk se postupně naváží s přesností na 0,1 mg asi 2,5 mg, 5,0 mg, 10,0 mg a 20,0 mg *ethylenglykolu R*. Přidá se 5 ml *tetrahydrofuranu R* a důkladně se protřepe. Baňky se znovu zváží a vypočítá se koncentrace ethylenglykolu v mg/g pro každý porovnávací roztok.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony pro gelovou chromatografii délky 0,6 m a vnitřního průměru 7 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (5 μm, porozita 10 nm),
- mobilní fáze, kterou je *tetrahydrofuran R*, s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- diferenciálního refraktometrického detektoru.

Nastříkne se 40 μl zkoušeného roztoku a 40 μl každého porovnávacího roztoku. Koncentrace ethylenglykolu ve zkoušeném roztoku (c) se stanoví z kalibrační křivky získané za použití porovnávacích roztoků.

Vypočte se procentuální obsah volného ethylenglykolu P_1 podle vzorce:

$$\frac{c \cdot m_2}{m_1 \cdot 10} .$$

Z plochy píku monoesterů (s_1) a diesterů (s_2) se vypočte procentuální obsah monoesterů podle vzorce:

$$\frac{s_1}{s_1 + s_2} \cdot [100 - (P_1 + P_2)] ,$$

v němž značí:
P_1 - obsah volného ethylenglykolu v procentech,
P_2 - obsah volných mastných kyselin v procentech, vypočte se podle vzorce:

$$P_2 = \frac{I_A \cdot 270}{561{,}1} ,$$

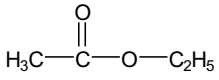
v němž značí:
I_A - číslo kyselosti.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Ethylis acetas

Ethylacetat



$C_4H_8O_2$ M_r 88,11 CAS 141-78-6

Je to ethylester kyseliny octové.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá těkavá kapalina. Je dobře rozpustný ve vodě, mísitelný s acetonem, s lihem 96% a s dichlormethanem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota varu *(2.2.12)*. 76 °C až 78 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. ethylacetatu*.

C. Vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

D. Vyhovuje zkoušce na estery *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Směs 1 ml zkoušené látky a 15 ml *vody R* je čirá *(2.2.1)* a bezbarvá *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml *lihu 96% R* se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a tolik *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS,* aby vzniklo růžové zbarvení. Přidá se 5,5 ml zkoušené látky a 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS;* roztok zůstane nejméně 15 s růžový.

Relativní hustota *(2.2.5*). 0,898 až 0,902.

Index lomu *(2.2.6*). 1,370 až 1,373.

Reakce s kyselinou sírovou. 2 ml se opatrně přidají k 10 ml *kyseliny sírové R*. Na styku obou kapalin do 15 min nevznikne zbarvení.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. Zkoušená látka.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (136 μm až 173 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se zvyšuje rychlostí 8 °C/min z 90 °C až na 240 °C, při níž se udržuje 8 min; teplota nástřikového prostoru a detektoru je 240 °C.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, větší než 0,2 % plochy hlavního píku.

Odparek. 100,0 g se odpaří do sucha na vodní lázni a potom se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 3 mg (30 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 10,0 ml zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě do 30 °C.

Nečistoty

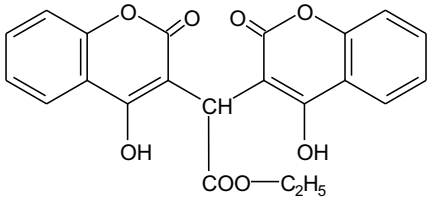
A. methylacetat,
B. ethanol,
C. methanol.

† Ethylis biscoumacetas

N

Ethylbiskumacetat

Synonymum. Ethylum biscumaceticum



$C_{22}H_{16}O_8$ M_r 408,36 CAS 548-00-5

Je to ethylester kyseliny bis(4-hydroxy-2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-yl)octové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 96,5 % sloučeniny $C_{22}H_{16}O_8$ Celkový obsah počítaný na vysušenou látku a vyjádřený jako součet ethylbiskumacetatu, volné kyseliny bisoxykumarinyloctové a 4,4′-anhydroderivátu ethylbiskumacetatu je v rozmezí 98,5 % až 101,5 %.

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96 %. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 178 °C až 182 °C.

B. 25,0 mg se rozpustí ve 25 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml *methanolu R*, 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 200 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 222 nm a 310 nm, a dvě prodlevy, při 240 nm a 290 nm.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ethylbiskumacetatu CRL.*

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí ve 20,0 ml *chloroformu R*, roztok se použije také ke zkoušce absorbance. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku ze zkoušky Vzhled roztoku měřená v 50mm vrstvě při 420 nm za použití *chloroformu R* jako kontrolního roztoku je nejvýše 0,14.

Volná kyselina bisoxykumarinyloctová. Nejvýše 1,6 %, počítáno na vysušenou látku. 2,500 g se rozpustí v 60 ml *acetonu R,* přidá se 24 ml *vody R*, 5,5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a 10 min se nechá roztokem probublávat dusík. Potom se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* v atmosféře dusíku za potenciometrické indikace (skleněná a nasycená kalomelová elektroda, derivační křivka) (*2.2.20*) do druhého inflexního bodu. Odečte se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* mezi prvním a druhým inflexním bodem. Tato spotřeba se použije také ve zkoušce Stanovení obsahu.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 38,03 mg kyseliny bisoxykumarinyloctové.

Jiné organické látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *ethylbiskumacetatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (2 + 5 + 5) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, jsou přítomny dvě skvrny odpovídající kyselině bisoxykumarinyloctové a 4,4′-anhydroderivátu ethylbiskumacetatu. Žádná další skvrna není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

4,4′-Anhydroderivát ethylbiskumacetatu. Nejvýše 1,4 %. K 0,800 g se v baňce se zabroušenou zátkou přidá 50 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (58 g/l) a 10 min se třepe. Nerozpuštěný zbytek se odfiltruje předem zváženým filtrem ze slinutého skla (4). Baňka i filtr se promyjí po malých dávkách asi 50 ml *vody R*, zbytek se suší 3 h při 105 °C a nechá se vychladnout v exsikátoru; zbytek váží nejvýše 0,011 g.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,2 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3000 g (*m*) se rozpustí v 60 ml *acetonu R*, přidá se 24 ml *vody R,* roztokem se nechá 10 min probublávat dusík a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* způsobem uvedeným ve zkoušce Volná kyselina bisoxykumarinyloctová, viz Zkoušky na čistotu. Od nalezené spotřeby se odečte spotřeba zjištěná ve zkoušce Volná kyselina bisoxykumarinyloctová přepočtená na navážku (*m*).

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 40,84 mg $C_{22}H_{16}O_8$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

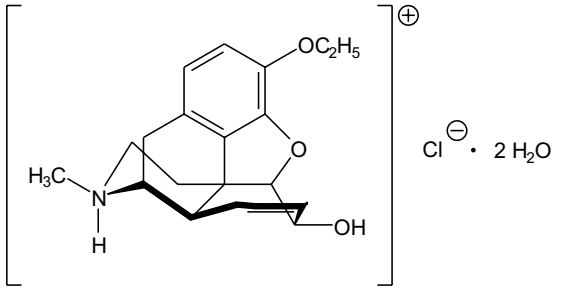
A. kyselina bisoxykumarinyloctová,

B. 4,4′-anhydroderivát ethylbiskumacetatu.

§§ Ethylmorphini hydrochloridum

Ethylmorfiniumchlorid

Synonyma. Ethylmorfinium chloratum, Aethylmorfinium chloratum



$C_{19}H_{24}ClNO_3 . 2H_2O$ M_r 385,89 CAS 6746-59-4

M_r bezvodého 349,86

Je to dihydrát (5*R*,6*S*)-4,5-epoxy-3-ethoxy-6-hydroxy-N-methyl-7-morfineniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{19}H_{24}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. ethylmorfinumchloridu.*

B. 0,5 g se rozpustí ve zkumavce v 6 ml *vody R* a přidá se 15 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS.* Krystalizace se urychlí třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky. Bílá krystalická sraženina se odfiltruje, promyje se a rozpustí ve 20 ml *vody R* zahřáté na 80 °C. Zfiltruje se a ochladí se ve vodě s ledem. Krystaly 12 h sušené ve vakuu tají *(2.2.14)* při 85 °C až 89 °C.

C. K asi 10 mg se přidá 1 ml *kyseliny sírové R*, 0,05 ml *chloridu železitého RS2* a zahřeje se na vodní lázni; vznikne modré zbarvení. Přidá se 0,05 ml *kyseliny dusičné R;* zbarvení se změní na červené.

D. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,3 až 5,7; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -102° až -105°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, acetonu R, lihu 96% R* a *toluenu R* (2,5 + 32,5 + 35 + 35). Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 8,0 % až 10,0 %; stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *acetanhydridu R*, 5 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,99 mg $C_{19}H_{24}ClNO_3$.

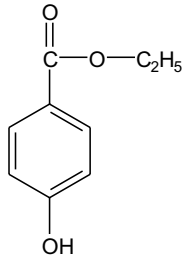
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Omamná látka.

Ethylparabenum

Ethylparaben

Synonymum. Ethylis parahydroxybenzoas



$C_9H_{10}O_3$ M_r 166,18 CAS 120-47-8

Je to ethyl-4-hydroxybenzoat. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_9H_{10}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v etheru, v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 115 °C až 118 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ethylparabenu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. K asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS*, zahřeje se k varu na 30 s a ochladí (roztok a). K dalším asi 10 mg v podobné zkumavce se přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS;* látka se částečně rozpustí (roztok b). K roztokům (a) a (b) se současně přidá 5 ml *aminopyrazolonu RS* a 1 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS* a promíchá se; roztok (b) je žlutý nebo oranžově hnědý; roztok (a) je oranžový nebo červený a jeho zbarvení je zřetelně intenzivnější než zbarvení roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidají 3 ml *lihu 96% R*, 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Stanoví se tenkovrstvou chromatografií (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *ethylparabenu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *methylparabenu CRL* se rozpustí v 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, vody R* a *methanolu R* (1 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nepřevyšuje žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se odváží do baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 40,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zpětný chladič propláchne 5 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá do baňky. Nadbytek hydroxidu sodného se titruje *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 166,2 mg $C_9H_{10}O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Nečistoty

A. 4-hydroxybenzoat,

B. methyl-4-hydroxybenzoat (methylparaben),

C. propyl-4-hydroxybenzoat (propylparaben),

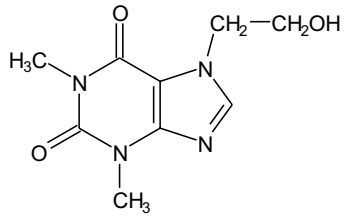
D. butyl-4-hydroxybenzoat (butylparaben).

† Etofyllinum

1998

Etofylin

Synonymum. Aethophyllinum



$C_9H_{12}N_4O_3$ M_r 224,22 CAS 519-37-9

Je to 7-(2-hydroxyethyl)-1,3-dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{12}N_4O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 161 °C až 166 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *etofylinu CRL*. Měří se tablety připravené z 0,5 mg až 1 mg látek a 0,3 g *bromidu draselného R*.

C. 1 g se rozpustí v 5 ml *acetanhydridu R* a vaří se 15 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 100 ml směsi objemových dílů *etheru R* a *etheru petrolejového R* (20 + 80) a chladí se nejméně 20 min ve vodě s ledem za občasného protřepání. Zfiltruje se, sraženina se promyje směsí objemových dílů *etheru R* a *etheru petrolejového R* (20 + 80), rekrystalizuje se z *lihu 96% R* a vysuší se ve vakuu. Krystaly tají *(2.2.14)* při 101 °C až 105 °C.

D. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Přidáním nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se změní zbarvení indikátoru na modré.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,3 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 30) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.

Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,2 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *theofylinu R* se rozpustí v *methanolu R*, přidá se 0,3 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (400 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Aby se předešlo přehřátí reakční směsi, promíchává se co nejdokonaleji a titrace se ukončí ihned, jakmile se dosáhne bodu ekvivalence.

0,200 g se rozpustí ve 3,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50,0 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

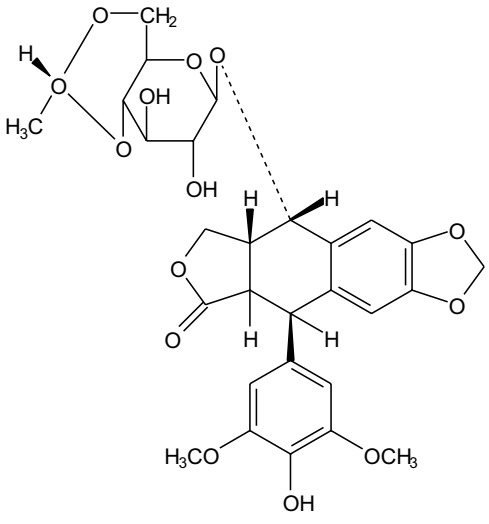
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,42 mg $C_9H_{12}N_4O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Etoposidum

Etoposid



$C_{29}H_{32}O_{13}$ M_r 588,56 CAS 33419-42-0

Je to (5*R*,5*aR*,8*aR*,9*S*)-9-[(4,6-O-(*R*)-ethyliden-β-D-glukopyranosyl)oxy]-5-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-5,8,8*a*,9-tetrahydro-isobenzofuro[5,6-*f*][1,3]benzodioxol-6[5*aH*]-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{29}H_{32}O_{13}$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v dichlormethanu a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *etoposidu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Ve zkumavce se rozpustí asi 5 mg zkoušené látky v 5 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 0,05 ml *chloridu železitého RS1*. Roztok se promíchá, opatrně se navrství 2 ml *kyseliny sírové R* tak, aby vznikly dvě vrstvy, a nechá se asi 30 min stát; vzniká růžové až červenohnědé zbarvení na styku obou vrstev a žluté zbarvení horní vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,6 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok stupně 6 nejpodobnějšího zbarvení *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -106° až -114°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 50 mg ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředěním stejnou směsí na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se jí na 2 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R a dichlormethanu R* (1 + 9) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *etoposidu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se jí na 2 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 4 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese do 10mm proužků po 5 μl každého roztoku. Zkoušený roztok (a) se nanáší jako poslední. Vyvíjí se ihned směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R, acetonu R* a *dichlormethanu R* (1,5 + 8 + 20 + 100) po dráze 17 cm. Vrstva se suší 5 min v proudu teplého vzduchu, postříká se směsí objemových dílů *kyseliny sírové R* a *lihu 96% R* (1 + 9) a 15 min se zahřívá při 140 °C. Potom se vrstva ihned přikryje skleněnou deskou stejné velikosti a hodnotí se v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 0,500 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C pod vysokým vakuem.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *etoposidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). K 10 ml zkoušeného roztoku se přidá 0,1 ml roztoku *kyseliny octové R* (4% *V/V)* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Přidává se *hydroxid sodný 1 mol/l VS* do vzniku slabě růžového zbarvení (asi 0,15 ml). Po 15 min se přidá 0,1 ml roztoku *kyseliny octové R* (4% *V/V*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),

- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny octové R* (4% *V/V*) (24 + 76), průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 285 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b) a zaznamenává se chromatogram, dokud není eluován pík fenolftaleinu. Relativní retenční čas píku fenolftaleinu vzhledem k etoposidu je asi 2,7.

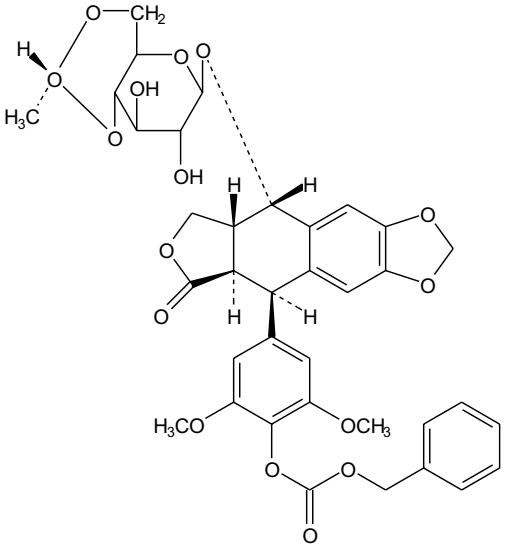
Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu jsou dva hlavní píky a rozlišení mezi těmito píky je nejméně 1,5; nepřihlíží se k píku fenolftaleinu. K získání uvedeného rozlišení, je-li třeba, se sníží koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo se sníží průtoková rychlost mobilní fáze. Nastříkne se šestkrát 10 μl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku etoposidu nejvýše 2,0 %. Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (a).

Obsah $C_{29}H_{32}O_{13}$ v procentech se vypočítá z ploch píků a deklarovaného obsahu *etoposidu CRL*.

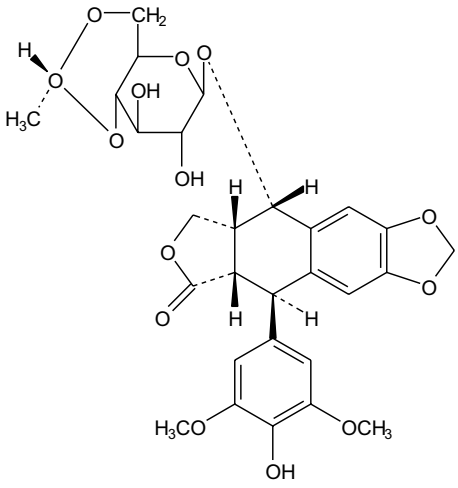
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

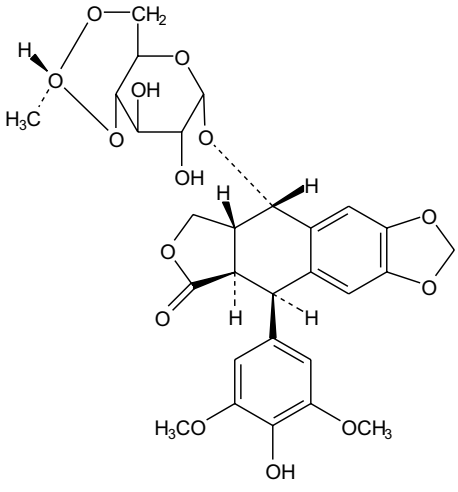
Nečistoty



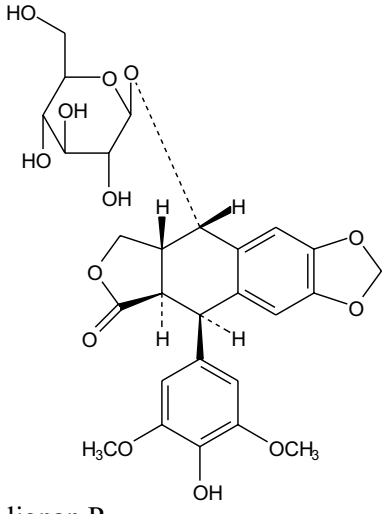
A. 4′-karbobenzoxyethylidenlignan P,



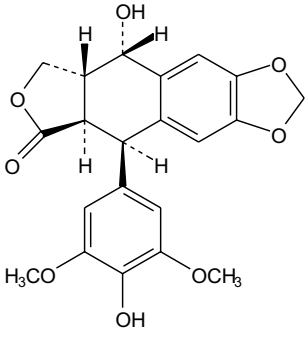
B. pikroethylidenlignan P,



C. α-ethylidenlignan P,



D. lignan P,



E. 4′-demethyl-epipodofylotoxin.

Eucalypti etheroleum

1998

Blahovičníková silice

Synonyma. Eucalypti aetheroleum, Oleum eucalypti

Je to silice získaná destilací s vodní párou a následnou rektifikací z čerstvých listů nebo čerstvých koncových větévek různých druhů rodu *Eucalyptus* bohatých na cineol, jedná se zejména o *Eucalyptus globulus* LABILL., *Eucalyptus fructicetorum* MUELL.F.v. (*Eucalyptus polybractea* BAK.,R.T) a *Eucalyptus smithii* BAK., R.T.

Obsahuje nejméně 70,0 % cineolu (eukalyptolu).

Vlastnosti

Bezbarvá nebo světle žlutá kapalina aromatického kafrového pachu a pronikavé kafrové, později chladivé chuti.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,1 g zkoušené látky se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 μl *cineolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 μl *citronellalu R* se rozpustí v 5 ml *toluenu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS,* suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je ve střední části skvrna cineolu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrna odpovídá polohou a zbarvením skvrně cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a); na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další, méně intenzivní skvrny.

Chromatogram se použije ke zkoušce na čistotu Jiné druhy rodu Eucalyptus.

Zkoušky na čistotu

Optická otáčivost *(2.2.7).* 0° až +10°.

Relativní hustota *(2.2.5).* 0,906 až 0,925.

Index lomu *(2.2.6).* 1,458 až 1,470.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10).* Rozpouští se v pěti objemových dílech *lihu R* 70% *(V/V).*

Jiné druhy rodu Eucalyptus. Na chromatogramu zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti není v horní polovině patrná skvrna odpovídající skvrně citronellalu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Aldehydy. 10 ml zkoušené látky se převede do zkumavky o vnitřním průměru 25 mm a délky 150 mm se zabroušenou zátkou, přidá se 5 ml *toluenu R* a 4 ml *hydroxylamoniumchloridu v lihu RS.* Silně se protřepe a ihned se titruje *hydroxidem draselným 0,5 mol/l v lihu 60% (V/V) VS* do změny červeného zbarvení na žluté. V titraci se za protřepávání pokračuje; bod ekvivalence je dosažen, jestliže se žluté zbarvení spodní vrstvy nezmění do 2 min po důkladném protřepání a následném oddělení vrstev. Reakce je ukončena do asi 15 min.

Stanovení se opakuje s dalšími 10 ml zkoušené látky. Jako porovnávací roztok pro bod ekvivalence se použije ztitrovaný roztok z prvního stanovení, k němuž se přidá 0,5 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l v lihu 60% (V/V) VS.* Při druhé titraci se spotřebuje nejvýše 2,0 ml *hydroxidu draselného 0,5 mol/l v lihu 60% (V/V) VS.*

Felandren. 1 ml se smíchá se 2 ml *kyseliny octové ledové R* a 5 ml *etheru petrolejového R1*, přidají se 2 ml nasyceného roztoku *dusitanu sodného R* a mírně se protřepe; v horní vrstvě se do 1 h netvoří krystalická sraženina.

Stanovení obsahu

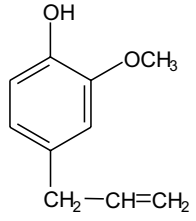
Provede se stanovení 1,8-cineolu v silicích *(2.8.11).*

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před teplem.

Eugenolum

Eugenol



$C_{10}H_{12}O_2$ M_r 164,20 CAS 97-53-0

Je to 2-methoxy-4-allylfenol.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo světle žlutá čirá kapalina, na vzduchu tmavnoucí, výrazného pachu po hřebíčku. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 70% (*V/V*), prakticky nerozpustný v glycerolu, mísitelný s dichlormethanem, s etherem, s kyselinou octovou, s lihem 96% a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *eugenolu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 50 μl zkoušené látky se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok. 50 μl *eugenolu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 0,05 ml zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vzniká tmavě zelené zbarvení, které se do 10 min změní na žlutavě zelené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Jeden objemový díl zkoušené látky se smíchá se dvěma objemovými díly *lihu R* 70% (*V/V*). Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_4$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,066 až 1,070.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,540 až 1,542.

Příbuzné látky. Nejvýše 2,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,10 ml zkoušené látky se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R,* impregnovanou 5 % *makrogol 20 000 2-nitrotereftalatu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se 2 min udržuje na 80 °C, pak se zvyšuje rychlostí 8 °C/min, až se dosáhne teploty 240 °C, při níž se udržuje 15 min; teplota nástřikového prostoru je 250 °C a teplota detektoru 300 °C.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku. Obsah příbuzných látek v procentech se vypočítá z ploch píků chromatogramu zkoušeného roztoku metodou vnitřní normalizace.

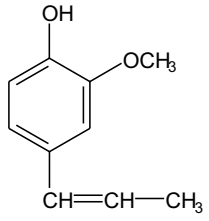
Uhlovodíky. 1 ml se ve zkumavce se zátkou rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidá se 30 ml *vody R* a ihned se pozoruje; roztok je žlutý a čirý *(2.2.1)* a na vzduchu se kalí.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g.

Uchovávání

Ve zcela naplněných dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty



A. 2-methoxy-4-(1-propenyl)fenol (isoeugenol).

Fagi pix

N

Bukový dehet

Synonymum. Pix fagi

Je to dehet získaný suchou destilací dřeva druhu *Fagus sylvatica* L.

Vlastnosti

Viskózní hnědočerná tekutina, charakteristického pachu po kreosotu. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mísitelný s vazelínou a tuky.

Zkoušky totožnosti

Roztok S. 1 g se smíchá s 20 ml *vody R* a protřepává se 10 min. Pak se zfiltruje.

A. Roztok S reaguje kysele na lakmusový papír.

B. K 5 ml roztoku S se přidává po kapkách roztok *chloridu železitého R* (1 g/l); vznikne hnědočervené zbarvení.

C. 5 ml roztoku S se smíchá s 0,1 ml *bromové vody R;* vznikne zákal.

D. 5 ml roztoku S se smíchá se 4 ml *vínanu měďnatého RS* a krátce se povaří; vznikne oranžová sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hustota (*2.2.5*). 1,100 až 1,220 g/ml.

Dehet ze dřeva jehličnanů. 1 g se smíchá s 15 ml *etheru petrolejového R,* protřepává se 5 min a pak se zfiltruje. 10 ml filtrátu se smíchá s 5 ml roztoku *octanu měďnatého R* (1 g/l) a protřepává se 5 min. Horní vrstva se nebarví zeleně; přidá se 10 ml *etheru R;* zbarvení se nemění.

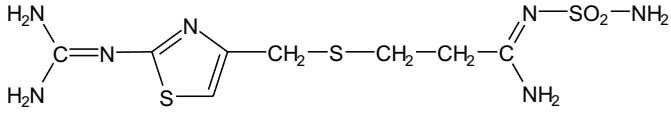
Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 0,3 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Famotidinum

Famotidin



$C_8H_{15}N_7O_2S_3$ M_r 337,43 CAS 76824-35-6

Je to N^2-(aminosulfonyl)-3-[[[2-[(diaminomethylen)amino]-4-thiazolyl]methyl]thio] propanamidin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_8H_{15}N_7O_2S_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu a v kyselině octové ledové, těžce rozpustný v methanolu, velmi těžce rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru a ethylacetatu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Vyskytuje se ve dvou formách, které tají při asi 163 °C a při asi 169 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 25,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku o pH 2,5 (1)* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem o pH 2,5 (1)* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 265 nm. Specifická absorbance v maximu je 297 až 315, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *famotidinu CRL*. Pokud spektra jsou rozdílná, suspenduje se 0,10 g zkoušené látky a porovnávací látky odděleně v 5 ml *vody R*. Zahřeje se k varu, nechá se vychladnout a třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky se urychlí krystalizace. Krystaly se odfiltrují, promyjí se 2 ml ledové *vody R* a 1 h se suší v sušárně při 80 °C při tlaku nepřekračujícím 670 Pa. Se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (f).

D. Za třepání se rozpustí asi 5 mg zkoušené látky a asi 3 mg *p-fenylendiamoniumdichloridu R* v 5 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l). Přidá se asi 0,1 g *zinku práškového R*, zamíchá se a nechá se 2 min stát. Přidá se 5 ml *síranu amonno-železitého RS6* a zamíchá se. Vzniká modré nebo fialově modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,20 g se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (50 g/l), v případě potřeby se zahřeje na 40 °C a zředí se stejnou kyselinou na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Zkouší se tenkovrstvou chromatografií *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu (5 µm) s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 3 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 4 mg *famotidinu nečistoty A CRL* se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou octovou ledovou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (e). 4 mg *famotidinu nečistoty B CRL* se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.
Porovnávací roztok (f). 20 mg *famotidinu CRL* se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 5 µl každého roztoku tak, že se nanáší po 1 µl za sušení proudem *dusíku R* po každém nanesení. Deska s vrstvou se umístí do exsikátoru na 2 h a vyvíjí se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *toluenu R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (2 + 20 + 25 + 40). Vrstva se suší na vzduchu, dokud je patrný pach rozpouštědel, a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající famotidinu nečistotě A není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající famotidinu nečistotě A, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %); nejvýše tři takové skvrny jsou intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny a na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je viditelná skvrna.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 µg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 5 h suší v sušárně při 80 °C a tlaku nepřekračujícím 670 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

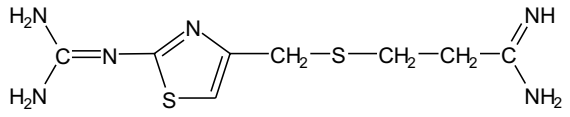
0,120 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,87 mg $C_8H_{15}N_7O_2S_3$.

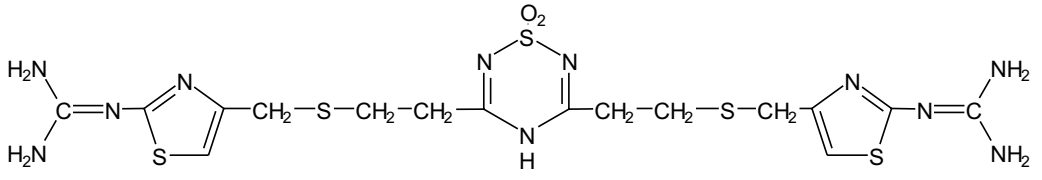
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

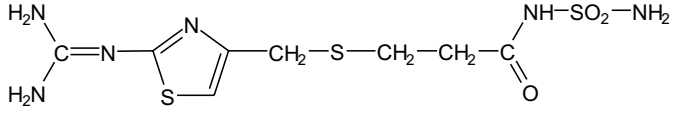
Nečistoty



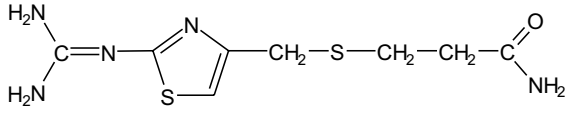
A. 3-{[2-(diaminomethylenamino)thiazol-4-yl]methylthio}propionamidin,



B. 3,5-bis{[2-(diaminomethylenamino)thiazol-4-yl]methylthioethyl}-4*H*-1,2,4,6-thiatriazin-1,1--dioxid,



C. N-(aminosulfonyl)-3-{[2-[(diaminomethylenamino)thiazol-4-yl]methylthio}propionamid,



D. 3-{[2-(diaminomethylenamino)thiazol-4-yl]methylthio}propionamid.

Farfarae folium

N

Podbělový list

Synonymum. Folium farfarae

Je to usušená listová čepel druhu *Tussilago farfara* L.

Vlastnosti

Droga slabě medovitého pachu, chuti slizovité, poněkud nahořklé.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Čepel o průměru až 20 cm s krátkým zbytkem řapíku, srdčitě okrouhlá, mělce dlanitě laločnatá, tuhá, lámavá. Laloky mělce oddáleně zubaté, zuby černě hrotité. Čepel mladých listů na obou stranách hustě běloplstnatá, na svrchní straně záhy vločkovitě olysávající, tmavozelená až žlutozelená, svraskalá. Dlanitá žilnatina hrubá, na spodní straně silně vyniklá, často spolu s okrajem čepele červenofialově naběhlá.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v chloralhydrátu. Na svrchní straně listu buňky pokožky 40 μm až 60 μm velké, mnohohranné nebo se stěnami mírně vlnitě zprohýbanými, tenkými. Kutikula výrazně zvrásněná, v okolí průduchů a báze chlupů vrásnění paprsčité. Na spodní straně listu buňky pokožky drobnější, se stěnami silně vlnitě zprohýbanými. Anomocytické průduchy (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu. Krycí chlupy čtyřbuněčné až sedmibuněčné, jednořadé, 100 μm až 250 μm dlouhé, o průměru 10 μm až 12 μm, bazální buňky drobné, tenkostěnné, často kolabované, koncová buňka velmi dlouhá, ztlustlá, bičovitě zprohýbaná, na konci zaoblená, někdy se šroubovitou trhlinou. Na svrchní straně listu většinou zůstávají jen báze chlupů. List bifaciální. Palisádový parenchym dvouřadý až čtyřřadý, vnější vrstva z buněk krátkých s drobnými intercelulárami, ostatní vrstvy z dlouhých buněk s velkými intercelulárami. Houbový parenchym mnohořadý s velkými intercelulárami zejména na spodní straně listu. V mezofylu krystaly nebo hrudky inulinu.

C. Práškovaná droga. Prášek je šedozelený, plstnatý. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s buňkami mnohohrannými, tenkostěnnými se zvrásněnou kutikulou; krycí chlupy nebo jejich úlomky, bazální buňky drobné, často kolabované, koncová buňka velmi dlouhá, ztlustlá, bičovitě zprohýbaná, na konci zaoblená, někdy se šroubovitou trhlinou; úlomky mezofylu s krystaly nebo hrudkami inulinu, s třířadým až čtyřřadým palisádovým parenchymem s jednou řadou buněk velmi krátkých a s ostatními řadami buněk dlouhých; úlomky houbového parenchymu s velkými intercelulárami.

D. 2,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 20,0 ml *vody R*, vaří se 2 min a pak se zfiltruje. 10,0 ml filtrátu se smíchá s 10,0 ml *lihu 96% R* a po důkladném protřepání se zfiltruje. Sraženina na filtru se kvantitativně rozpustí v 10,0 ml *vody R;* případný zákal se odstraní opakovanou filtrací. 5,0 ml čirého filtrátu se smíchá s 5,0 ml *lihu 96% R;* vznikne intenzivní bílá opalescence (slizy).

E. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 10,0 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 70 °C. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 1,0 mg *kyseliny kávové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 30 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *2-butanonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu a pak několik minut při 100 °C až 105 °C. Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylborylоxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R.* Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v poloze vymezené skvrnami kyseliny kávové a hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku patrné nejméně čtyři žlutozelené až oranžové skvrny; v poloze vymezené skvrnami hyperosidu a rutinu jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku patrny jedna nebo dvě modré skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 %.

Druhy rodu *Petasites* L. a *Arctium* L. Nejsou přítomny listy srdčitě okrouhlé, tenké nebo až tuhé, kožovité, na svrchní straně olysalé, na spodní straně tence plstnaté až plstnaté s okrajem čepele zubatým až cípatě laločnatým, zuby tupými až tupě chrupavčitými, oddálenými (*Petasites* sp.) nebo listy srdčitě okrouhlé, celokrajné až oddáleně zubaté, na svrchní straně lysé nebo pýřité, na spodní straně plstnaté (*Arctium* sp.). Při mikroskopickém pozorování nejsou v droze přítomny mnohobuněčné, jednořadé bičovitě zprohýbané krycí chlupy se stěnami ztlustlými; krycí chlupy mnohobuněčné, jednořadé, přímé nebo zakřivené se širokou bazální buňkou a s koncovou buňkou tupě kuželovitou; mnohobuněčné, jednořadé žláznaté chlupy s malou vejčitou hlavičkou (*Petasites* sp.) nebo krycí chlupy mnohobuněčné, jednořadé, až 500 μm dlouhé, často kolabované, s koncovou buňkou velmi dlouhou, bičovitou; žláznaté chlupy s krátkou dvoubuněčnou nohou a hlavičkou ze dvou řad buněk uzavřených v měchýřovité membráně, v mezofylu krystaly šťavelanu vápenatého (*Arctium* sp.).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku ze zkoušky totožnosti E. není patrna skvrna odpovídající polohou skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Petasiny, isopetasiny. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 2,0 g práškované drogy (355) se smíchá se 40,0 ml *etheru petrolejového R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje, baňka i filtr se promyjí malým množstvím *etheru petrolejového R.* Spojené filtráty se odpaří na objem asi 1,0 ml.
Porovnávací roztok. 5 μl *eugenolu R* a 5 μl *linalolu R* se rozpustí v *etheru petrolejovém R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se *chloroformem R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v poloze odpovídající eugenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku patrna žádná skvrna. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS1* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v poloze odpovídající linalolu na chromatogramu porovnávacího roztoku patrna žádná červenofialová skvrna. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného

roztoku nejsou v poloze vymezené skvrnami eugenolu a linalolu na chromatogramu porovnávacího roztoku patrné jiné než načervenalé až červené skvrny.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 19,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 4,0 %.

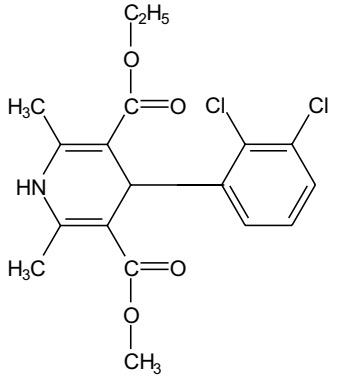
Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 10; stanoví se s 1,00 g práškované drogy (355).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Felodipinum

Felodipin



$C_{18}H_{19}Cl_2NO_4$ M_r 384,26 CAS 86189-69-7

Je to ethyl-methylester kyseliny (*RS*)-4-(2,3-dichlorfenyl)-1,4-dihydro-2,6-dimethylpyridin-3,5--dikarboxylové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{19}Cl_2NO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v dichlormethanu, v ethanolu a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. 3 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 220 nm až 400 nm. Roztok vykazuje absorpční maxima při 238 nm a 361 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 361 nm k absorbanci naměřené v maximu při 238 nm je 0,34 až 0,36.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *felodipinu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *felodipinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *nifedipinu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese oddělené po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *cyklohexanu R* (40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, fluorescencí a velikostí se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. 150 mg se rozpustí ve směsi 25 ml *terc.butanolu R* a 25 ml *kyseliny chloristé RS*. Přidá se 10 ml *síranu ceričitého 0,1 mol/l RS*, nechá se stát 15 min, přidá se 3,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Protřepe se s 25 ml *dichlormethanu R*. Spodní vrstva se odpaří na vodní lázni pod dusíkem (zbytek se také použije pro zkoušku Příbuzné látky). Asi 20 mg zbytku se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml. 2 ml se zředí *methanolem R* na 50 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 220 nm až 400 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 273 nm.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,00 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*).

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S měřená při 440 nm není vyšší než 0,10.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a).1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 50,0 mg zbytku získaného při zkoušce totožnosti D (nečistota A) a 25,0 mg *felodipinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m až 0,15 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R*, *acetonitrilu R*, *fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 3,0*, obsahujícího *kyselinu fosforečnou R* (0,8 g/l) a *dihydrogenfosforečnan sodný R* (8 g/l), (20 + 40 + 40). Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou píků nebyly menší než 20 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (nečistota A) a druhým píkem (felodipin) je nejméně 2,5. Dva další možné píky odpovídají nečistotě B a nečistotě C. Látky se vymývají v následujícím pořadí: nečistota B, nečistota A, felodipin a nečistota C.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času felodipinu, který je asi 12 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není součet ploch píků odpovídajících nečistotě B a nečistotě C větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píků odpovídajících nečistotě B a nečistotě C, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %) a součet jejich ploch není větší než trojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.2.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,160 g se rozpustí ve směsi 25 ml *terc.butanolu R* a 25 ml *kyseliny chloristé RS*. Přidá se 0,05 ml *feroinu RS* a titruje se *síranem ceričitým 0,1 mol/l VS*, dokud nevymizí růžové zbarvení. Před koncem titrace se titruje pomalu.

1 ml *síranu ceričitého 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,21 mg $C_{18}H_{19}Cl_2NO_4$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

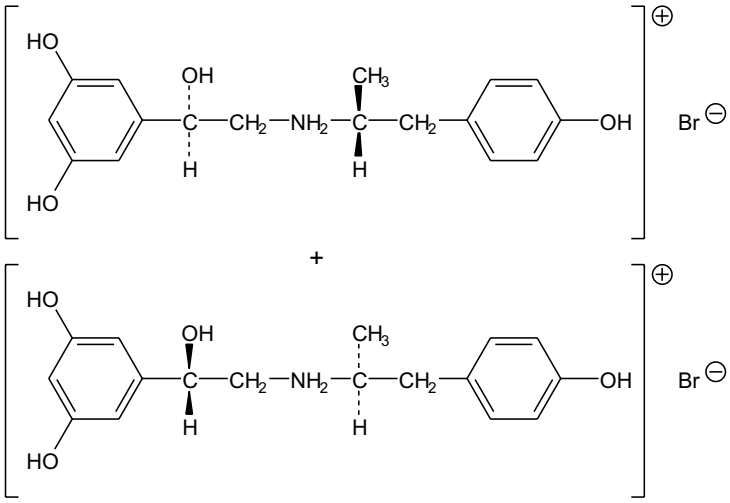
A. ethyl-methyl-4-(2,3-dichlorfenyl)-2,6-dimethylpyridin-3,5-dikarboxylat,

B. dimethyl-4-(2,3-dichlorfenyl)-1,4-dihydro-2,6-dimethylpyridin-3,5-dikarboxylat,

C. diethyl-4-(2,3-dichlorfenyl)-1,4-dihydro-2,6-dimethylpyridin-3,5-dikarboxylat.

† Fenoteroli hydrobromidum

Fenoteroliumbromid



$C_{17}H_{22}BrNO_4$ M_r 384,27 CAS 1944-12-3

Je to N-{(*RS*)-[2-hydroxy-2-(3,5-dihydroxyfenyl)ethyl]}-N-[(*RS*)-1-(4-hydroxyfenyl)-2-propyl]--amoniumbromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{22}BrNO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS1* a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS1* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 275 nm a prodlevu při asi 280 nm. Specifická absorbance v maximu je 80 až 86.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *fenoteroliumbromidu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *fenoteroliumbromidu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *methanolu prostého aldehydů R* (1,5 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (10 g/l). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou, zbarvením a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 10 mg se rozpustí v roztoku *tetraboritanu sodného R* (20 g/l), zředí se jím na 50 ml, přidá se 1 ml roztoku *aminopyrazolonu R* (10 g/l), 10 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (2 g/l) a 10 ml *dichlormethanu R*. Po protřepání a oddělení vrstev se spodní vrstva zbarví červenohnědě.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,2 až 5,2; měří se roztok S.

Fenon. Absorbance *(2.2.25)* roztoku S měřená při 330 nm není větší než 0,42 (0,2 %).

Diastereoizomery. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 25,0 mg *fenoteroliumbromidu CRL* (obsahujícího 4,0 % diastereoizomerů) se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok připravený následovně: ke směsi 1 objemového dílu roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (9 g/l) a 69 objemových dílů roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (24 g/l), u níž bylo předem upraveno pH na hodnotu 8,5 pomocí *kyseliny fosforečné R*, se přidá 30 objemových dílů *methanolu R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška píku diastereoizomerů eluovaných ihned po hlavním píku nebyla menší než 10 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška minima oddělujícího pík diastereoizomerů od hlavního píku není menší než 4 % stupnice zapisovače; retenční čas hlavního píku je méně než 20 min.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku. Změří se výška píku každého diastereoizomeru na obou chromatogramech spuštěním kolmice z vrcholu píku k čáře vedené od minima mezi oběma píky k základní linii. Na chromatogramu zkoušeného roztoku výška tohoto píku není větší než výška odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (4,0 %).

Železo *(2.4.9)*. Zbytek ze zkoušky Síranový popel se rozpustí ve 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Takto připravený roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (5 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,600 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *síranu amonno-železitého RS2*. Protřepe se a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do oranžového zbarvení. Provede se slepá zkouška.

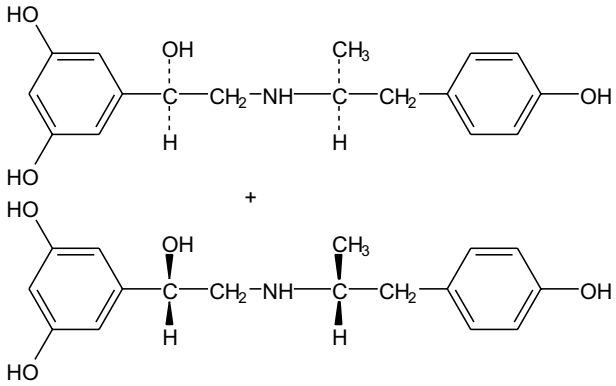
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 38,43 mg $C_{17}H_{22}BrNO_4$.

Uchovávání

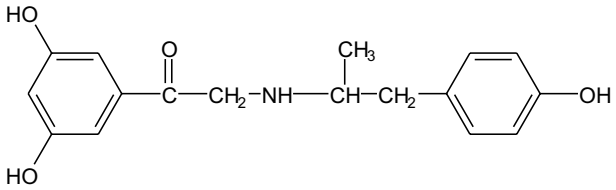
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



A. (*RS*)-1-(3,5-dihydroxyfenyl)-2-{(*SR*)-1-[2-(4-hydroxyfenyl)isopropylamino]}ethanol,

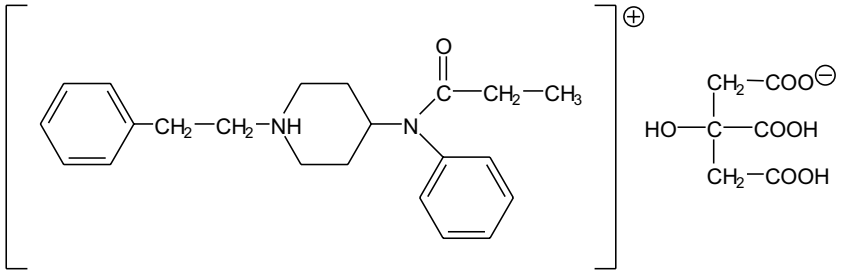


B. 1-(3,5-dihydroxyfenyl)-2-{(*RS*)-1-[2-(4-hydroxyfenyl)isopropylamino]}ethanon(fenon).

§§ Fentanyli dihydrogenocitras

Fentanyliumdihydrogencitrat

Synonymum. Fentanyli citras



$C_{28}H_{36}N_2O_8$ M_r 528,60 CAS 990-73-8

Je to 4-(N-fenyl-N-propionyl)amino-1-fenethylpiperidiniumdihydrogencitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{28}H_{36}N_2O_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Taje při teplotě asi 152 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. fentanyliumdihydrogencitratu.*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). Pro přípravu rozkladné sloučeniny (nečistota D) *in situ* se 10 mg zkoušené látky rozpustí v 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se na vodní lázni 4 h pod zpětným chladičem. Pak se zneutralizuje 10,0 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Ochladí se, zbytek se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a zfiltruje se.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové oceloové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min s následujícím gradientovým programem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 → 15	90 → 40	10 → 60	lineární gradient
15 → 20	40	60	izokratická eluce
20 → 25	90	10	přepnutí na původní podmínky
25 = 0	90	10	začátek dalšího gradientu

- *mobilní fáze A* - roztok *uhličitanu amonného R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *tetrahydrofuranu R* a *vody R* (10 + 90),
- *mobilní fáze B* - *acetonitril R*,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Kolona se promývá do ustavení rovnováhy nejméně 30 min *acetonitrilem R* a pak nejméně 5 min mobilní fází o počátečním složení. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu 10 µl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy: fentanylu asi 10 min; nečistoty D asi 12 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem fentanylu a píkem nečistoty D je nejméně 8,0; je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo se upraví program lineárního gradientu.

Nastříkne se odděleně 10 µl *methanolu R* (slepá zkouška), 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k žádnému píku získanému ve slepé zkoušce, k žádnému píku, jehož relativní retenční čas vzhledem k hlavnímu píku je 0,05 nebo méně, a k žádnému píku s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu při 60 °C.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7). Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru.

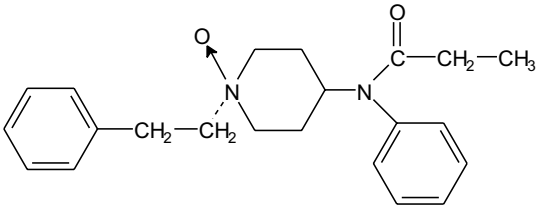
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 52,86 mg $C_{28}H_{36}N_2O_8$.

Uchovávání

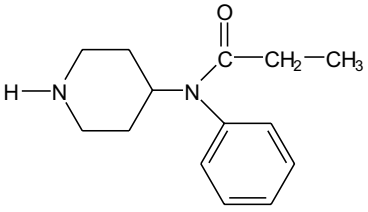
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Omamná látka.

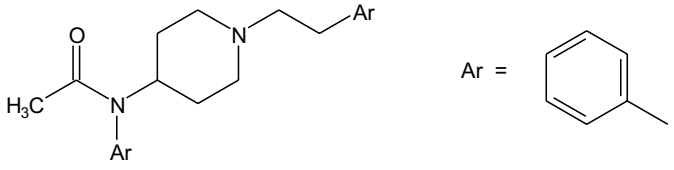
Nečistoty



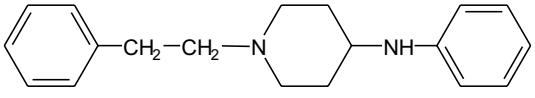
A. N-oxid N-fenyl-N-[1(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]propionamid,



B. N-fenyl-N-(piperidin-4-yl)propionamid,



C. N-fenyl-N-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]acetamid,

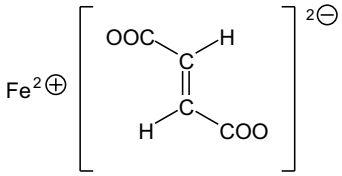


D. N-fenyl-1-(2-fenylethyl)piperidin-4-amin.

Ferrosi fumaras

Fumaran železnatý

Synonymum. Ferrum fumaricum



$C_4H_2FeO_4$ M_r 169,90 CAS 141-01-5

Je to železnatá sůl kyseliny (*E*)-butendiové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 93,0 % sloučeniny $C_4H_2FeO_4$.

Vlastnosti

Jemný červenooranžový nebo červenohnědý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok. K 1 g se přidá 25 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni. Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se použije ve zkoušce C. Zbytek se promyje 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody R* (1 + 9) a promývací tekutina se odstraní. Zbytek se vysuší při 100 °C až 105 °C. 20 mg zbytku se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok. 20 mg *kyseliny fumarové CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *dichlormethanu R, 1-butanolu R* a *heptanu R* (12 + 16 + 32 + 44) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. 0,5 g se smíchá s 1 g *resorcinolu R*. K 0,5 g směsi v kelímku se přidá 0,15 ml *kyseliny sírové R* a opatrně se zahřívá; tvoří se tmavě červená polotuhá hmota. Tato hmota se opatrně převede do 100 ml *vody R;* vznikne oranžově žluté zbarvení a roztok nefluoreskuje.

C. Filtrát získaný ve zkoušce totožnosti A vyhovuje zkoušce (a) na železo *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Sírany *(2.4.13)*. 0,15 g se zahřívá s 8 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 20 ml *vody destilované R*. Ochladí se ve vodě s ledem, zfiltruje se a zředí se *vodou destilovanou R* na 30 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,2 %).

Arsen *(2.4.2)*. 1,0 g se smíchá s 15 ml *vody R* a 15 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se do úplného vysrážení kyseliny fumarové. Ochladí se, přidá se 30 ml *vody R*, zfiltruje se a sraženina se promyje *vodou R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí a zředí se *vodou R* na 125 ml. 25 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Železo (Fe^{3+}). Nejvýše 2,0 %. 3,0 g se rozpustí v baňce se zabroušenou zátkou ve směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 100 ml *vody R* a rychle se zahřeje k varu. 15 s se vaří, potom se rychle ochladí, přidají se 3 g *jodidu draselného R*, baňka se uzavře a nechá se 15 min stát chráněna před světlem. Přidají se 2 ml *škrobu RS* jako indikátoru a titruje se uvolněný jod *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška. Rozdíl mezi spotřebami při těchto titracích odpovídá jodu uvolněnému železitým iontem.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,585 mg Fe^{3+}.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se vaří opatrně s 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, ochladí se, zfiltruje se a promyje se malými množstvími *vody R*. Filtrát a promývací tekutiny se spojí, přidají se 2 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a vaří se do zmenšení objemu na 5 ml. Po ochlazení se přidají 3 ml *vody R*, 12 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, roztok se převede do dělicí nálevky a protřepe se pětkrát 20 ml isobutylmethylketonu nasyceného kyselinou chlorovodíkovou (připraví se protřepáním 100 ml čerstvě předestilovaného *isobutylmethylketonu R* s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*). Spojené vodné vrstvy se vaří do zmenšení objemu asi na 10 ml, ochladí se, upraví se pH roztoku *amoniakem zředěným RS1* na 4 a zředí se *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se mírným zahřátím rozpustí v 7,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, ochladí se, přidá se 25 ml *vody R* a 0,1 ml *feroinu RS*. Ihned se titruje *tetrasulfatoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do změny oranžového zbarvení na světle modrozelené.

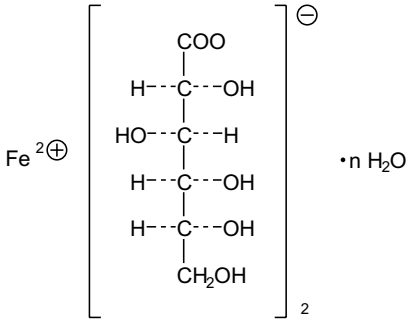
1 ml *tetrasulfatoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,99 mg $C_4H_2FeO_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Ferrosi gluconas

Glukonan železnatý



$C_{12}H_{22}FeO_{14}$. nH_2O M_r bezvodého 446,14 CAS 299-29-6

Je to hydratovaná železnatá sůl kyseliny D-glukonové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 11,8 % až 12,5 % dvojmocného železa.

Vlastnosti

Zelenožlutý až šedý prášek nebo granule. Je snadno, ale pomalu rozpustný ve vodě na zelenohnědý roztok, snadněji je rozpustný v horké vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí, je-li třeba zahřátím ve vodní lázni při 60 °C, ve 2 ml *vody R.*

Porovnávací roztok. 20 mg *glukonanu železnatého CRL* se rozpustí, je-li třeba zahřátím ve vodní lázni při 60 °C, ve 2 ml *vody R.*

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R, amoniaku 26% R, vody R* a *lihu 96%* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se 20 min suší při 100 °C až 105 °C, nechá se zchladnout a postříká se roztokem *dichromanu draselného R* (50 g/l) ve 40% roztoku *kyseliny sírové R.* Po 5 min je hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku shodná polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na železo *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R,* zahřeje se na 60 °C, ochladí se a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok pozorovaný proti světlu je čirý *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,5; měří se roztok S za 3 h až 4 h po jeho přípravě.

Sacharosa a redukující cukry. 0,5 g se rozpustí v 10 ml teplé *vody R*, přidá se 1 ml *amoniaku zředěného RS1* a 30 min se nechá probublávat *sirovodíkem R*. Filtruje se, sraženina se promyje dvakrát 5 ml *vody R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí, okyselí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* za použití *papíru lakmusového modrého R* a navíc se přidají 2 ml stejné kyseliny. Roztok se vaří, dokud unikající páry nezpůsobují další tmavnutí *papíru s octanem olovnatým R*, a dále se vaří, dokud se objem nezmenší asi na 10 ml. Ochladí se, přidá se 15 ml *uhličitanu sodného RS* a po 5 min stání se zfiltruje. Filtrát se zředí *vodou R* na 100 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml *vínanu měďnatého RS*, 1 min se vaří a nechá se 1 min stát; nevznikne červená sraženina.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,8 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,06 %).

Šťavelany. 5,0 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a přidá se 40 ml *vody R*. Roztok se třepe 5 min s 50 ml *etheru R*. Vodná vrstva se oddělí a třepe se 5 min s 20 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 15 ml *vody R* a zfiltruje se. Filtrát se vaří, dokud se jeho objem nezmenší na 5 ml. Přidá se 1 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 1,5 ml *chloridu vápenatého RS* a nechá se 30 min stát; nevznikne sraženina.

Sírany *(2.4.13)*. Ke 3,0 ml roztoku S se přidají 3 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g). Roztoky se pozorují proti světlu.

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Baryum. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml, přidá se 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a nechá se 5 min stát. Tento roztok neopalizuje intenzivněji než směs 10 ml roztoku S a 45 ml *vody destilované* R. Roztoky se pozorují proti světlu.

Železo (Fe^{3+}). Nejvýše 1,0 %. 5,00 g se v baňce se zabroušenou zátkou rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Přidají se 3 g *jodidu draselného R*, baňka se uzavře a nechá se 5 min stát chráněna před světlem. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace. Provede se slepá zkouška. Při titraci se spotřebuje nejvýše 9,0 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,5 g se dokonale smíchá v křemenném kelímku s 0,5 g *oxidu hořečnatého R1* a žíhá se do matné červeně, dokud se nezíská homogenní hmota. 1 h se žíhá při 800 °C a po ochlazení se ke zbytku přidá 20 ml horké *kyseliny chlorovodíkové R*. Po ochlazení se tekutina převede do dělicí nálevky a třepe se 3 min třikrát s 20 ml isobutylmethylketonu R nasyceného kyselinou chlorovodíkovou (připraví se protřepáním 100 ml čerstvě předestilovaného *isobutylmethylketonu R* s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*). Nechají se oddělit vrstvy a vodná vrstva se varem odpaří na polovinu objemu, ochladí se a zředí se *vodou R* na 25 ml. 7,5 ml tohoto roztoku se neutralizuje za použití *papíru lakmusového červeného R* a *amoniaku zředěného RS1* a zředí se *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 7,0 % až 10,5 %; 0,500 g se suší 5 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v 1 gramu. Stanoví se plotnovou metodou.

Stanovení obsahu

0,5 g *hydrogenuhličitanu sodného R* se rozpustí ve směsi 30 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 70 ml *vody R*. Když směs přestane šumět, přidá se 1,000 g zkoušené látky a opatrným mícháním se rozpustí. Přidá se 0,1 ml *feroinu RS* a titruje se *hexanitratoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku červeného zbarvení.

1 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,585 mg dvojmocného železa.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Ferrosi sulfas

Síran železnatý

$FeSO_4 . 7H_2O$ M_r 278,01 CAS 7782-63-0

M_r bezvodého 151,90

Je to heptahydrát síranu železnatého. Obsahuje 98,0 % až 105,0 % sloučeniny $FeSO_4 . 7H_2O$.

Vlastnosti

Krystalický světle zelený prášek nebo modrozelené krystalky, na vzduchu větrající. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný ve vroucí vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Oxidací na vlhkém vzduchu se barví do hněda.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na sírany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na železo *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 4,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným ropouštědlem na 10 ml.

Chloridy *(2.4.4)*. 3,3 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml a přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (300 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 10 ml základního *roztoku chloridu* (5 μg Cl/ml) a 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Pro tuto zkoušku se použije 0,15 ml *dusičnanu stříbrného RS2*.

Železo (Fe^{3+}). Nejvýše 0,5 %. 5,00 g se v kuželové baňce se zabroušenou zátkou rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Přidají se 3 g *jodidu draselného R*, baňka se uzavře a nechá se 5 min stát ve tmě. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem*

sodným 0,1 mol/l VS za použití 0,5 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace. Za stejných podmínek se provede slepá zkouška. Při titraci se spotřebuje nejvýše 4,5 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, přidají se 2 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a vaří se do odpaření tekutiny na 5 ml. Ochladí se, zředí se *kyselinou chlorovodíkovou RS* na 20 ml, převede se do dělicí nálevky a třepe se 3 min třikrát s 20 ml isobutylmethylketonu nasyceného kyselinou chlorovodíkovou (připraví se protřepáním 100 ml čerstvě předestilovaného *isobutylmethylketonu R* s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*). Nechají se oddělit vrstvy a vodná vrstva se varem odpaří na polovinu objemu, ochladí se a zředí se *vodou R* na 25 ml (roztok a). 7,5 ml roztoku (a) se neutralizuje za použití *papíru lakmusového R* a *amoniaku zředěného RS1* a zředí se *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Mangan. Nejvýše 0,1 %. 1,0 g se rozpustí ve 40 ml *vody R*, přidá se 10 ml *kyseliny dusičné R* a vaří se, dokud vznikají červené plyny. Přidá se 0,5 g *peroxodisíranu diamonného R* a 10 min se vaří. Případné růžové zbarvení se odstraní přidáváním po kapkách roztoku *siřičitanu sodného R* (50 g/l) a varem se odstraní pach oxidu siřičitého. Přidá se 10 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny fosforečné R*, 0,5 g *jodistanu sodného R*, vaří se 1 min a ochladí se. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 1,0 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS*, k němuž se přidají stejné objemy zkoumadel.

Zinek. Nejvýše 500 μg/g. K 5 ml roztoku (a) získaného ve zkoušce Těžké kovy se přidá 1 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS* a zředí se *vodou R* na 13 ml. Po 5 min vzniklý zákal není intenzivnější než porovnávací roztok připravený současně smícháním 10 ml základního *roztoku zinku (10 μg Zn/ml)*, 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 1 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS*.

Stanovení obsahu

2,5 g *hydrogenuhličitanu sodného R* se rozpustí ve směsi 150 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny sírové R*. Když směs přestane šumět, přidá se 0,500 g zkoušené látky a opatrným mícháním se rozpustí. Přidá se 0,1 ml *feroinu RS* a titruje se *hexanitratoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku červeného zbarvení.

1 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,80 mg $FeSO_4 . 7H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Fibrini glutinum

Fibrinové lepidlo

Skládá se ze dvou základních složek: složka 1 (koncentrát fibrinogenu) je bílkovinná frakce obsahující lidský fibrinogen a lidský faktor XIII a složka 2 je přípravek obsahující lidský trombin. Tato druhá složka přeměňuje první na fibrin po rekonstituci a smíchání za přítomnosti iontů vápníku. Ostatní látky (např. lidský fibronektin a inhibitor plasminu jako aprotinin) a stabilizátory (např. lidský albumin) mohou být přidány před nebo v průběhu trombinem indukované tvorby fibrinu. Nepřidávají se protimikrobní konzervační látky.

Lidské složky se získávají z plazmy pro frakcionaci, která vyhovuje požadavkům článku Plasma humanum ad separationem. K použité plazmě se nepřidávají žádná antibiotika.

Po roztátí nebo rozpuštění v předepsaném objemu rozpouštědla obsahuje složka 1 nejméně 60 g srazitelné bílkoviny v litru a nejméně 10 jednotek faktoru XIII v mililitru. Účinnost trombinu ve složce 2 má široké rozmezí (přibližně od 4 m.j. do 500 m.j./ml).

Výroba

Metoda přípravy zahrnuje postup nebo postupy, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují známá infekční agens. Jsou-li k inaktivaci virů použity v průběhu výroby nějaké látky, následné čisticí postupy jsou validovány, aby se prokázalo, že koncentrace těchto látek je snížena na vyhovující úroveň a jejich zbytky neohrozí bezpečnost přípravku pro nemocné.

Složky nebo směsi složek se filtrují filtry zadržujícími bakterie a asepticky se rozplňují do sterilních nádob. Nádoby s lyofilizovanými složkami se uzavírají ve vakuu nebo se před uzavřením plní dusíkem prostým kyslíku nebo jiným vhodným inertním plynem. V každém případě se uzavírají tak, aby se vyloučila kontaminace mikroorganismy.

Vlastnosti

Lyofilizované složky jsou bílé nebo slabě žluté prášky nebo sypké hmoty. Zmražené složky jsou bezbarvé nebo slabě žluté neprůsvitné hmoty. Kapalné složky jsou bezbarvé nebo slabě žluté.

Lyofilizované a zmražené složky se předepsaným způsobem rozpustí nebo nechají roztát bezprostředně před provedením zkoušky totožnosti a dalších zkoušek s výjimkou zkoušky na rozpustnost a obsah vody.

I. Složka 1 (koncentrát fibrinogenu)

Zkoušky totožnosti

A. U zkoušeného přípravku se provedou precipitační zkoušky s vhodným rozsahem druhově specifických sér. Doporučuje se provést tyto zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných v příslušné zemi k přípravě látek biologického původu. Zkoušený přípravek obsahuje bílkoviny lidského původu a dává negativní reakce se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

B. Stanovení fibrinogenu přispívá k ověření totožnosti složky 1.

C. Stanovení faktoru XIII přispívá k ověření totožnosti složky 1.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 8,0.

Rozpustnost. Lyofilizované koncentráty se do 20 min rozpustí v předepsaném objemu rozpouštědla a při předepsané teplotě. Vznikne téměř bezbarvý, jasný nebo slabě zakalený roztok.

Stabilita roztoku. Do 120 min od rozpuštění nebo roztátí se nevytvoří gel.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; provede se u lyofilizovaných přípravků.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení obsahu a účinnosti

Fibrinogen (srazitelná bílkovina). *Použije se metoda A nebo metoda B.* Stanovený obsah srazitelné bílkoviny v miligramech je 70 % až 130 % deklarovaného množství.

A. *Srazitelná bílkovina* (stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou). K 0,2 ml rekonstituovaného zkoušeného přípravku se přidají 2 ml vhodného tlumivého roztoku (pH 6,6 až 6,8) obsahujícího dostatečné množství *trombinu R* (přibližně 3 m.j./ml) a vápníku (0,05 mol/l). Nechá se 20 min stát při 37 °C, sraženina se oddělí odstřeďováním (5000 g_n, 20 min), důkladně se promyje roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) a stanoví se bílkovina jako dusík po mineralizaci s kyselinou sírovou (*2.5.9*). Obsah bílkoviny se vypočítá násobením výsledku faktorem 6,0.

B. *Zkouška srážlivosti.* Rekonstituovaný zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby obsah fibrinogenu byl v rozmezí 0,1 mg/ml až 1 mg/ml. 0,2 ml zředěného přípravku se nechá stát 60 s při 37 °C a potom se přidají 0,2 ml vhodného roztoku *trombinu R* (přibližně 20 m.j./ml, který obsahuje nejméně 1 mmol vápníku/l). Vhodnou metodou se stanoví doba srážení. Postup se opakuje alespoň s třemi různými ředěními (ve výše uvedeném rozsahu) vhodného porovnávacího fibrinogenu (např. referenční lidská plazma). Referenční lidská plazma se kalibruje postupem podle této zkoušky proti smíšené čerstvé plazmě od více než 100 dárců. Ze vztahů naměřených časů srážení pro ředění porovnávacího přípravku a obsahu fibrinogenu se na logaritmický papír sestrojí kalibrační křivka. Z této křivky se odečte obsah fibrinogenu ve zkoušeném přípravku.

Faktor XIII. Pro stanovení účinnosti (funkční faktor XIII) se připraví vhodná ředění rekonstituované složky 1 a referenční lidské plazmy smícháním s roztokem obsahujícím *chlorid sodný R* (9 g/l) a lidský albumin (4 g/l). Ke každému ředění se přidá takové množství roztoku hovězího fibrinogenu, který nemá aktivitu faktoru XIII ($A_{\mathrm{F\ XIII}}$), a přebytek vápníku a trombinu, aby došlo ke koagulaci fibrinogenu. Nechá se stát 1 h při 37 °C. Do každé zkumavky se přidá vhodné množství roztoku *kyseliny chloroctové R* (10 g/l), protřepe se každých 10 min a za 30 min se zaznamená pro každý vzorek nejvyšší ředicí faktor (D), při němž koagulát ještě není rozpuštěn. Účinnost faktoru XIII v jednotkách na mililitr se vypočítá ze vzorce:

$$A_{\mathrm{F\ XIII}} = \frac{D_{\mathrm{comp\ 1}}}{D_{\mathrm{ref}}} \cdot A_{\mathrm{F\ XIII(ref)}} \cdot$$

Stanovená účinnost vyjádřená v jednotkách je nejméně 60 % a nejvýše 140 % udávané účinnosti.

II. Složka 2 (trombinový přípravek)

Zkoušky totožnosti

A. U zkoušeného přípravku se provedou precipitační zkoušky s vhodným rozsahem druhově specifických sér. Doporučuje se provést tyto zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných v příslušné zemi k přípravě látek biologického původu. Přípravek obsahuje bílkoviny lidského původu a dává negativní reakce se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

B. Stanovení trombinu přispívá k ověření totožnosti složky 2.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 8,0.

Rozpustnost. Lyofilizované přípravky se do 5 min rozpustí v předepsaném objemu rozpouštědla; vznikne bezbarvý, čirý nebo slabě zakalený roztok.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; provede se u lyofilizovaných přípravků.

Sterilita (*2.6.1*) Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Trombin. Rekonstituovaný zkoušený přípravek se rozpustí v roztoku obsahujícím *chlorid sodný R* (9 g/l) a *albumin hovězí R* (10 g/l) a zředí se jím na přibližnou koncentraci 4 m.j. až 10 m.j. trombinu v mililitru. 0,1 ml zředěného roztoku se smíchá s 0,9 ml roztoku fibrinogenu (1 g/l srazitelné bílkoviny) zahřátého na 30 °C a okamžitě se začne měřit čas srážení.

Postup se opakuje nejméně s třemi ředěními referenčního přípravku trombinu (v rozmezí uvedeném výše), kalibrovaného v mezinárodních jednotkách. Ze vztahu naměřených časů srážení referenčního přípravku a obsahu jednotek trombinu se na logaritmický papír sestrojí kalibrační křivka. Z této křivky se odečte obsah trombinu ve zkoušeném přípravku v mezinárodních jednotkách.

Stanovená účinnost je nejméně 80 % a nejvýše 125 % udávané účinnosti.

Uchovávání

Chráněno před světlem.

Označování

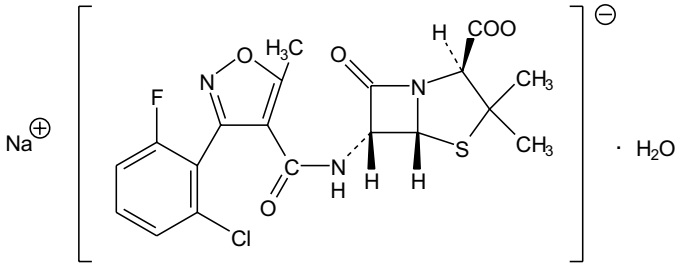
V označení se uvede:

- množství fibrinogenu (v miligramech srazitelné bílkoviny), faktoru XIII (v jednotkách) a trombinu (v mezinárodních jednotkách) v příslušném obalu,
- kde je to vhodné, objem rozpouštědla na rozpuštění přípravku.

† Flucloxacillinum natricum

1998

Sodná sůl flukloxacilinu



$C_{19}H_{16}ClFN_3NaO_5S$. H_2O M_r 493,87 CAS 34214-51-2

M_r bezvodé 475,85

Je to monohydrát sodné soli kyseliny (6*R*)-6-[3-(2-chlor-6-fluorfenyl)-5-methyl-4-isoxazolkarboxamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{16}ClFN_3NaO_5S$.

Výroba

Pokud se vyrábí způsobem, který může v látce zanechat zbytky kyseliny 2-ethylhexanové, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,8 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě a v methanolu, dobře rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli flukloxacilinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného H R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *sodné soli kloxacilinu CRL*, 25 mg *sodné soli dikloxacilinu CRL* a 25 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou*

ledovou R na 5,0, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a hodnotí se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je slabě zelenožlutý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; roztok zežloutne.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). Absorbance roztoku S měřená při 430 nm (*2.2.25*) je nejvýše 0,04.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +158° až +168°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se zkoušený roztok (a) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 5násobku retenčního času hlavního píku. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (5,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se ve zkumavce se zabroušenou zátkou přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- teplota kolony se udržuje na 120 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C.

Nastřikuje se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 4,5 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku zkoušené látky (20 mg/ml) ve *vodě na injekci R*.

Stanovení obsahu

Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *sodné soli flukloxacilinu CRL* a 5 mg *sodné soli kloxacilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min. Je to směs objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (2,7 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na hodnotu 5,0, a *acetonitrilu R (75 + 25)*,
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (c). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavních píků na chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (kloxacilin) a druhým píkem (flukloxacilin) je nejména 2,5. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku flukloxacilinu je nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Uchovávání

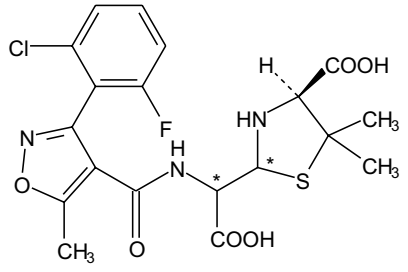
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

Separandum.

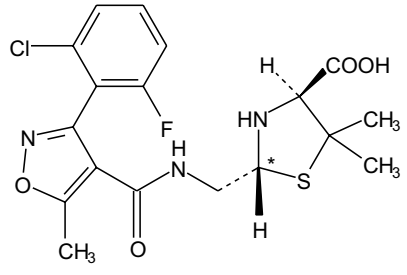
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

Nečistoty

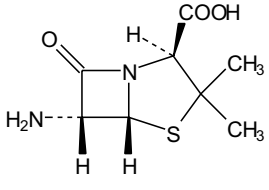


A. kyselina (4*S*)-2-{karboxy{[[3-(6-fluorfenyl-2-chlor)-5-methylisoxazol-4-yl]karbonyl]amino}--methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny flukloxacilinu),

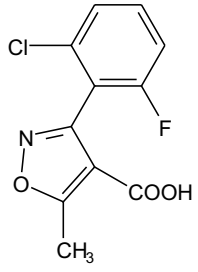


a epimer k C*

B. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{{[[3-(6-fluorfenyl-2-chlor)-5-methylisoxazol-4-yl]karbonyl]amino}-methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny flukloxacilinu),



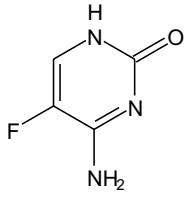
C. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-6-amino-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylová (kyselina 6-aminopenicilanová),



D. kyselina 3-(6-fluorfenyl-2-chlor)-5-methylisoxazol-4-karboxylová.

† Flucytosinum

Flucytosin



$C_4H_4FN_3O$ M_r 129,09 CAS 2022-85-7

Je to 4-amino-5-fluor-2(1*H*)-pyrimidinon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_4FN_3O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *flucytosinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R,* 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do vzniku bezbarvého roztoku. Zfiltruje se a k filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu*

zirkoničitého RS. Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvení roztoku s kontrolním roztokem připraveným současně stejným způsobem; červené zbarvení roztoku se změní na žluté.

D. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,15 ml *bromové vody R* a protřepe se; roztok se odbarví.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ nebo $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 15) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 15) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *flucytosinu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 15) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 15) na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *fluorouracilu CRL* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R, methanolu R* a *ethylacetatu R* (1 + 15 + 25 + 60) po dráze 12 cm. Po vytěkání rozpouštědel volně na vzduchu se vrstva vystaví na 5 min parám chloru v uzavřené komoře, do které byla předem na 15 min vložena miska se směsí objemových dílů roztoku *manganistanu draselného R* (15 g/l), *kyseliny chlorovodíkové RS1* a *vody R* (2 + 1 + 1). Vrstva se suší v proudu studeného vzduchu do odstranění přebytku chloru; vrstva pod nanesenými body na startu nedává s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS* modré zbarvení. Vrstva se rovnoměrně postříká roztokem *škrobu s jodidem draselným R* a pozoruje se v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Fluoridy. Nejvýše 200 μg/g. Provede se potenciometrické stanovení fluoridů za použití fluoridové selektivní indikační elektrody a srovnávací argentchloridové elektrody. *Všechny roztoky se připravují a uchovávají v nádobách z plastů.*

Tlumivý roztok. 58 g *chloridu sodného R* se rozpustí v 500 ml *vody R*, přidá se 57 ml *kyseliny octové ledové R* a 200 ml roztoku *kyseliny cyklohexylendinitriltetraoctové R* (100 g/l) v roztoku *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*. Hodnota pH se upraví roztokem *hydroxidu sodného R* (200 g/l) na 5,0 až 5,5 a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.
Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. 4,42 g *fluoridu sodného R*, předem 2 h sušeného při 120 °C, se rozpustí v 300 ml *vody R* a zředí se jí na 1000,0 ml (roztok (a), 1,90 g/l fluoridů). Připraví se tři porovnávací roztoky ředěním roztoku (a) 1 ve 100, 1 v 1000 a 1 v 10 000.

K 20,0 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 10,0 ml tlumivého roztoku a magneticky se míchá. Elektrody se zavedou do roztoku, 5 min se roztok nechá stát za stálého míchání a změří

se rozdíl potenciálů mezi elektrodami. Hodnota potenciálu každého porovnávacího roztoku se nanese na semi-logaritmický papír jako funkce koncentrace fluoridů. Za přesně stejných podmínek se zjistí rozdíl potenciálu u zkoušeného roztoku a vypočítá se obsah fluoridů.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). *Použije se platinový kelímek*. Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky v platinovém kelímku.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 100 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,91 mg $C_4H_4FN_3O$.

Uchovávání

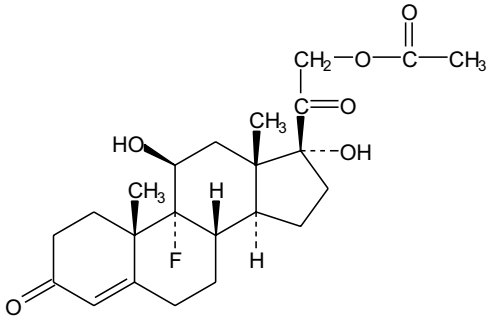
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Fludrocortisoni acetas

Fludrokortisonacetat

Synonymum. Fludrocortisonum aceticum



$C_{23}H_{31}FO_6$ M_r 422,49 CAS 514-36-3

Je to 9-fluor-11ß,17,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion-21-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{23}H_{31}FO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fludrokortisonacetatu CRL*. Pokud spektra získaná se vzorky v tuhém stavu jsou rozdílná, rozpustí se odděleně zkoušená i referenční látka v minimálním objemu *acetonu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra látek.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *fludrokortisonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *kortisonacetatu CRL* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá na denním světle polohou a barvou, v ultrafialovém světle při 365 nm fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě zkoušeného roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluoroethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se 5 min. Pak se zkumavka uzavře a zahřívá se 2 h 30 min ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem. Nechá se zchladnout.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *fludrokortisonacetatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě porovnávacího roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluoroethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se 5 min. Pak se zkumavka uzavře a zahřívá se 2 h 30 min ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem. Nechá se zchladnout.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků odpovídá na denním světle polohou a barvou, v ultrafialovém světle při 365 nm fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramech zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramech zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku až do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do vzniku bezbarvého roztoku. Zfiltruje se a k filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvením roztoku s kontrolním roztokem připraveným současně stejným způsobem; červené zbarvení roztoku se změní na žluté.

E. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +148° až +156°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,0 mg *fludrokortisonacetatu CRL* a 2,0 mg *hydrokortisonacetatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,2 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R*,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *tetrahydrofuranu R* a *vody R* (35 + 65), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastříkne se porovnávací roztok (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku činila 70 % až 90 % celé stupnice zapisovače.

Kolona se ustálí promýváním mobilní fází po dobu asi 30 min při průtokové rychlosti 1 ml/min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Jsou-li chromatogramy zaznamenány za popsaných podmínek, retenční časy jsou: hydrokortisonacetatu asi 8,5 min a fludrokortisonacetatu asi 10 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky hydrokortisonacetatu a fludrokortisonacetatu není menší než 1,0. Není-li dosaženo tohoto rozlišení, upraví se koncentrace tetrahydrofuranu v mobilní fázi. Zvýšením koncentrace tetrahydrofuranu se zkrátí retenční čas.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatografie se nechá probíhat po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na

chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 0,75násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

10,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238 nm.

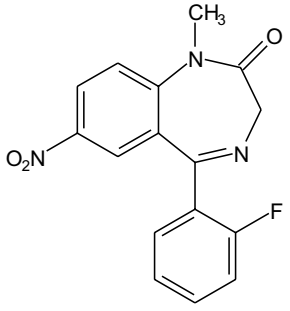
Obsah $C_{23}H_{31}FO_6$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 405.

Uchovávání

Separandum.

§ Flunitrazepamum

Flunitrazepam



$C_{16}H_{12}FN_3O_3$ M_r 313,29 CAS 1622-62-4

Je to 5-(2-fluorfenyl)-1-methyl-7-nitro-1*H*-1,4-benzodiazepin-2(3*H*)-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{16}H_{12}FN_3O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v etheru a v lihu 96% .

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 168 °C až 172 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *flunitrazepamu CRL*.

C. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 10 mg se rozpustí, je-li třeba zahřátím, ve 2 ml *methanolu R*. Přidá se 0,05 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vznikne intenzivní žluté zbarvení.

E. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku až do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do vzniku bezbarvého roztoku. Zfiltruje se a k filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se barva roztoku s kontrolním roztokem připraveným současně stejným způsobem; červené zbarvení roztoku se změní na žluté.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za ochrany před světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 20 ml. 3 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 8 mg *flunitrazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 8 mg *flunitrazepamu CRL* a 8 mg *nitrazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *nitromethanu R* (15 + 85) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,33 mg $C_{16}H_{12}FN_3O_3$.

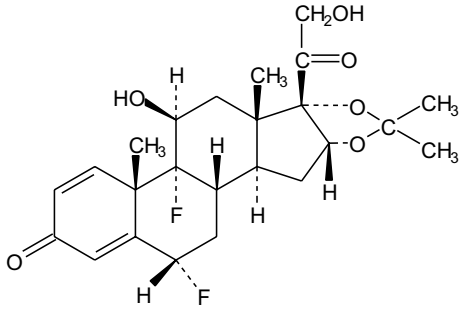
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

† Fluocinoloni acetonidum

Fluocinolonacetonid

Synonymum. Acetonid fluocinolonu



$C_{24}H_{30}F_2O_6$ M_r 452,49 CAS 67-73-2

Je to 6α,9-difluor-11β,21-dihydroxy-16α,17-isopropylidendioxy-1,4-pregnadien-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 104,0 % sloučeniny $C_{24}H_{30}F_2O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v petroletheru, dobře rozpustný v acetonu a v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fluocinolonacetonidu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití impregnované vrstvy *křemeliny G R*. Deska se vloží do komory obsahující potřebné množství směsi objemových dílů *formamidu R* a *acetonu R* (10 + 90) tak, aby byla deska ponořena ve směsi do výšky asi 5 mm. Vrstva se impregnuje vyvíjením směsí po dráze dosahující 1 cm nad předepsanou dráhu, potom se vyjme z komory a nechá se stát (asi 2 min až 5 min) do vymizení pachu rozpouštědel. Vrstva se použije do 2 h po impregnaci a vyvíjí se ve směru vyvíjení při impregnaci.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *fluocinolonacetonidu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *toluenu R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (14,5 + 28 + 57,5) po dráze 15 cm. Vrstva se zahřívá 15 min při 120 °C a potom se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS*. Pak se znovu zahřívá 15 min při 120 °C nebo až do vzniku skvrn. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku

odpovídá na denním světle polohou, zbarvením a velikostí a v ultrafialovém světle při 365 nm polohou, velikostí a fluorescencí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *křemeliny G R*, která se impregnuje způsobem uvedeným ve zkoušce B. Vrstva se použije do 2 h po impregnaci a vyvíjí se ve směru stejném jako při impregnaci.

Zkoušený roztok. 10 mg se v dělicí nálevce rozpustí v 1,5 ml *kyseliny octové ledové R,* přidá se 0,5 ml roztoku *oxidu chromového R* (20 g/l) a roztok se nechá 30 min stát. Pak se přidá 5 ml *vody R* a 2 ml *dichlormethanu R* a intenzivně se 2 min protřepává. Po oddělení se použije dolní vrstva.

Porovnávací roztok. 10 mg *fluocinolonacetonidu CRL* se v dělicí nálevce rozpustí v 1,5 ml *kyseliny octové ledové R,* přidá se 0,5 ml roztoku *oxidu chromového R* (20 g/l) a roztok se nechá 30 min stát. Pak se přidá 5 ml *vody R* a 2 ml *dichlormethanu R* a intenzivně se 2 min protřepává. Po oddělení se použije dolní vrstva.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *toluenu R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (14,5 + 28 + 57,5) po dráze 15 cm. Vrstva se zahřívá 15 min při 120 °C a potom se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS*. Pak se znovu zahřívá 15 min při 120 °C nebo až do vzniku skvrn. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá na denním světle polohou, zbarvením a velikostí a v ultrafialovém světle při 365 nm polohou, velikostí a fluorescencí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 0,5 ml nasyceného roztoku *oxidu chromového R* v *kyselině sírové R* se ve zkumavce zahřívá na přímém plameni až do vzniku bílého dýmu v horní části zkumavky. Roztok smáčí stěny zkumavky a nemá mastný vzhled. Přidají se asi 2 mg zkoušené látky a zahřívá se opět do vzniku bílého dýmu. Roztok nesmáčí stěny zkumavky a nedá se snadno vylít ze zkumavky.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +92° až +96°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 15,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml a měří se absorbance při 225 nm až 320 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 239 nm. Specifická absorbance v maximu je 345 až 375, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 5 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.

Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem R* na 50 ml.

Porovnávací roztok (a). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %)

a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g látky se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

V průběhu stanovení se roztoky chrání před světlem.

Barevné reakční produkty mají schopnost se absorbovat na povrch skleněného nádobí, což vede k nižším výsledkům. Skleněné nádoby ošetřené barevnými reakčními produkty se vyhradí pouze pro toto stanovení a mezi stanoveními se umývají pouze vodou R.

V odměrné baňce na 25 ml se rozpustí přesná navážka zkoušené látky v *lihu prostém aldehydů R* tak, aby 10,0 ml tohoto roztoku obsahovalo 300 μg až 350 μg zkoušené látky. Stejným způsobem se současně připraví porovnávací roztok rozpuštěním *fluocinolonacetonidu CRL*. Do třetí odměrné baňky na 25 ml (kontrolní roztok) se převede 10 ml *lihu prostého aldehydů R*. Do každé baňky se přidají 2,0 ml *trifenyltetrazoliumchloridu RS*. Vzduch nad roztokem se vytěsní proudem *dusíku prostého kyslíku R*, rychle se přidají 2,0 ml *tetramethylamoniumhydroxidu zředěného RS* a pokračuje se v zavádění *dusíku prostého kyslíku R*. Baňky se uzavřou a obsah se opatrně promíchá a zahřívá 1 h ve vodní lázni při 30 °C. Roztoky se rychle ochladí, zředí *lihem prostým aldehydů R* na 25,0 ml a ihned se měří absorbance *(2.2.25)* roztoků v uzavřených 1cm kyvetách proti kontrolnímu roztoku v maximu při 485 nm. Práce se provádí tak, aby doba od přidání *tetramethylamoniumhydroxidu zředěného RS* do měření absorbance byla u obou roztoků stejná.

Obsah $C_{24}H_{30}F_2O_6$ se vypočítá ze změřených absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

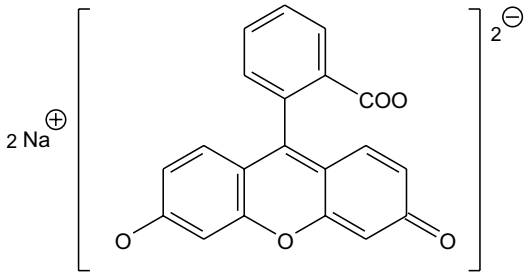
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Fluoresceinum natricum

1998

Sodná sůl fluoresceinu



$C_{20}H_{10}Na_2O_5$ M_r 376,27 CAS 518-47-8

Je to disodná sůl kyseliny 2-(3-oxo-6-oxido-3*H*-xanthen-9-yl)benzoové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{20}H_{10}Na_2O_5$.

Vlastnosti

Oranžově červený jemný hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v hexanu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 10 ml; roztok vykazuje žlutozelenou fluorescenci. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS;* fluorescence zmizí a po přidání 0,2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se fluorescence opět objeví.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. sodné soli fluoresceinu.*

C. Filtrační papír se povlhčí 0,05 ml roztoku připraveného pro zkoušku totožnosti A *(před přidáním kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*); papír se zbarví žlutě. Vlhký papír se vystaví na 1 min parám bromu a pak parám amoniaku; žluté zbarvení se změní na tmavě růžové.

D. 0,1 g se žíhá v porcelánovém kelímku. Zbytek se rozpustí v 5 ml *vody R* a zfiltruje se. 2 ml filtrátu vyhovují zkoušce (a) na sodík *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1),* oranžově žlutý a vykazuje žlutozelenou fluorescenci.

Hodnota pH. 7,0 až 9,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky a resorcinol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) v *methanolu R* a zředí se tímto roztokem na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,250 g se rozpustí v 5 ml *vody R* a pomocí 3 ml *vody R* se převede do dělicí nálevky, přidají se 2 ml *tlumivého roztoku o pH 8* a 2,5 g *chloridu sodného R*. Protřepává se do rozpuštění chloridu sodného a pak se protřepává dvakrát s 25 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Etherová vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a odpaří se do sucha za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Zbytek se rozpustí v 10 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) v *methanolu R*.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) v *methanolu R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) v *methanolu R* na 50 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) v *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *resorcinolu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (e). 5 ml porovnávacího roztoku (c) se smíchá s 1 ml zkoušeného roztoku (a) a roztok se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 5 μl zkoušeného roztoku (a) a (b) a porovnávacích roztoků (a), (b), (d) a (e) a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Pak se vystaví na 30 min působení par jodu a pozoruje se v denním světle.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) skvrna odpovídající resorcinolu není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny. Skvrny odpovídající resorcinolu jsou viditelné pouze po detekci parami jodu.

Dimethylformamid. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *dimethylacetamidu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 20 μl *dimethylacetamidu R* se zředí *vodou R* na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a za opatrného míchání se přidá 10 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (60 g/l). Nechá se 15 min stát a potom se odstřeďuje. V 5 ml supernatantní tekutiny se rozpustí 0,10 g *fosforečnanu sodného dodekahydrátu R.*
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí v 10 ml roztoku vnitřního standardu a za opatrného míchání se přidá 10 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (60 g/l). Nechá se 15 min stát a potom se odstřeďuje. V 5 ml supernatantní tekutiny se rozpustí 0,10 g *fosforečnanu sodného dodekahydrátu R.*
Porovnávací roztok. 20 μl *dimethylformamidu R* se zředí *vodou R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml, přidá se 10 ml roztoku vnitřního standardu a promíchá se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (135 μm až 175 μm), impregnovanou 10 % *makrogolu 1000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 170 °C.

Nastříkne se po 2 μl každého roztoku.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se vypočítá poměr plochy píku dimethylformamidu k ploše píku vnitřního standardu; tento poměr není větší než odpovídající poměr na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Chloridy (*2.4.4*). 10 ml roztoku S se smíchá s 90 ml *vody R* a 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a po 10 min se zfiltruje. 10 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml; roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,25 %).

Sírany *(2.4.13).* 5 ml roztoku S se smíchá s 90 ml *vody destilované R*, 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, zředí se *vodou destilovanou R* na 100 ml a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1,0 %).

Zinek. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zfiltruje se. Filtrát se smíchá s 0,1 ml *kyanoželeznatanu draselného RS;* nevznikne zákal ani sraženina.

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml.

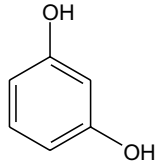
5,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem o pH 8,0* na 200,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 492 nm.

Vypočítá se obsah $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 2050.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

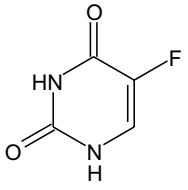
Nečistoty



A. resorcinol.

†† Fluorouracilum

Fluoruracil



$C_4H_3FN_2O_2$ M_r 130,08 CAS 51-21-8

Je to 5-fluor-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_3FN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fluorouracilu CRL*.

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,5 ml nasyceného roztoku *oxidu chromového R* v *kyselině sírové R* se ve zkumavce zahřívá na přímém plameni do vzniku bílého dýmu v horní části zkumavky. Roztok smáčí stěnu zkumavky a nemá mastný vzhled. Přidají se asi 2 mg zkoušené látky a zahřívá se opět do vzniku bílého dýmu; roztok nesmáčí stěny zkumavky.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ nebo $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 5,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *fluorouracilu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* na 200 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *5-hydroxyuracilu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (15 + 15 + 70) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *modři pravé B R* (5,0 g/l) a potom *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající 5-hydroxyuracilu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. *Použije se platinový kelímek.* 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 4 h suší ve vakuu při 80 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. *Použije se platinový kelímek.* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí za mírného zahřátí v 80 ml *dimethylformamidu R*. Po ochlazení se titruje *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za použití 0,25 ml roztoku *modři thymolové R* (10 g/l) v *dimethylformamidu R* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,01 mg $C_4H_3FN_2O_2$.

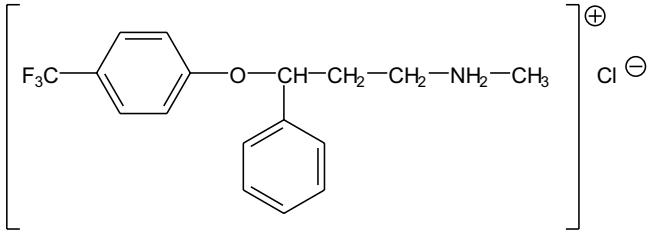
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

† Fluoxetini hydrochloridum

Fluoxetiniumchlorid



$C_{17}H_{19}ClF_3NO$ M_r 345,79 CAS 59333-67-4

Je to (*RS*)-N-methyl-3-fenyl-3-(4-trifluormethylfenoxy)propylamoniumchlorid. Počítáno na bezvodou a acetonitrilu prostou látku, obsahuje 98,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_{17}H_{19}ClF_3NO$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, snadno rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *fluoxetiniumchloridu CRL*.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (15 + 85) a zředí se touto směsí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,2 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Optická otáčivost (*2.2.7*). -0,05° až +0,05°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu, při 215 nm.

Zkoušený roztok (a). 55,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 22,0 mg *fluoxetiniumchloridu CRL* se rozpustí v 10,0 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS.* Roztok se zahřívá 3 h při teplotě asi 85 °C a pak se nechá zchladnout. Takto získaný roztok obsahuje fluoxetin nečistotu A a 4-trifluormethylfenol. K 0,4 ml tohoto roztoku se přidá 28,0 mg *fluoxetiniumchloridu CRL* a asi 1 mg *fluoxetinu nečistoty B CRL* a asi 1 mg *fluoxetinu nečistoty C CRL* a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.

Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou relativní retenční časy vztažené k fluoxetiniumchloridu: fluoxetinu nečistoty A asi 0,24, fluoxetinu nečistoty B asi 0,27 a fluoxetinu nečistoty C asi 0,94.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku je retenční čas píku fluoxetiniumchloridu 10 min až 18 min; retenční čas píku 4-fluormethylfenolu není větší než 35 min; poměr *h/v* není větší než 1,1 (*h* je vzdálenost mezi vrcholem píku fluoxetinu nečistoty C a základnou; *v* je vzdálenost mezi vrcholem píku fluoxetinu nečistoty C a nejnižším bodem křivky mezi píkem fluoxetinu nečistoty C a píkem fluoxetiniumchloridu). Jestliže je hodnota poměru větší než 1,1, sníží se objem methanolu a zvýší se objem roztoku triethylaminu v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne 10 µl zkoušeného roztoku (a) a 10 µl zkoušeného roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času fluoxetiniumchloridu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku odpovídajícího fluoxetinu nečistotě C není větší než 0,0015násobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) (0,15 %).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plochy píků odpovídajících fluoxetinu nečistotě A a fluoxetinu nečistotě B nejsou větší než 0,0125násobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (0,25 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píků odpovídajících fluoxetinu nečistotě A a B, není větší než 0,005násobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (0,1 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,0025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b).

Acetonitril. Nejvýše 0,1 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 5,0 ml.
Porovnávací roztok. K 1,0 g *acetonitrilu R* se přidá *dimethylformamid R* promíchá se a zředí se *dimethylformamidem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *dimethylformamidem R* na 1000,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony z křemenného skla délky 30 m a vnitřního průměru asi 0,53 mm s vnitřní stěnou potaženou filmem *makrogolu 20 000 R* (tloušťky 1 µm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 10 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se 2 min udržuje na 35 °C, potom se zvyšuje rychlostí 15 °C/min až na 220 °C, při níž se udržuje 10 min; teplota nástřikového prostoru a detektoru je 250 °C.

Nastříkne se odděleně 1 µl zkoušeného roztoku, 1 µl porovnávacího roztoku a 1 µl rozpouštědla.

Na chromatogramu porovnávacího roztoku se zaznamená retenční čas acetonitrilu.

Na chromatogramu rozpouštědla se ověří, že zde není pík s retenčním časem odpovídajícím acetonitrilu.

Plocha píku acetonitrilu na chromatogramu zkoušeného roztoku není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg/ml Pb)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 55,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok. 55,0 mg *fluoxetiniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1 ml/min složené z objemových dílů *methanolu R*, *tetrahydrofuranu R* a roztoku *triethylaminu R* (8 + 30 + 62); roztok *triethylaminu R* se připraví takto: k 10 ml *triethylaminu R* se přidá 980 ml *vody R*, hodnota pH roztoku se upraví na 6,0 *kyselinou fosforečnou R* (asi 4,5 ml) a roztok se zředí *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru, 227 nm.

Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Objemy methanolu a roztoku triethylaminu v mobilní fázi se upraví tak, aby retenční čas fluoxetiniumchoridu byl 10 min až 18 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže faktor symetrie počítaný v 10 % výšky píku fluoxetiniumchloridu není větší než 2,0.

Odděleně se nastříkne 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku.

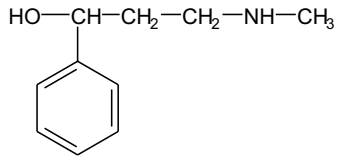
Obsah fluoxetiniumchloridu ($C_{17}H_{19}ClF_3NO$) se vypočítá z ploch píků na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a za použití udaného obsahu $C_{17}H_{19}ClF_3NO$ ve *fluoxetiniumchloridu CRL* upraveného s přihlédnutím k obsahu vody a acetonitrilu ve zkoušené látce.

Uchovávání

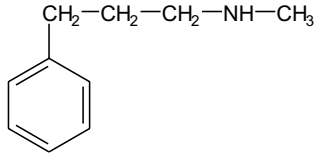
V dobře uzavřeném obalu.

Separandum.

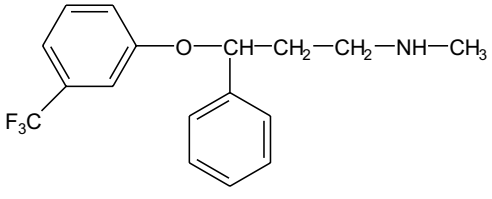
Nečistoty



A. (*RS*)-3-methylamino-1-fenyl-1-propanol,



B. methyl(3-fenylpropyl)amin,

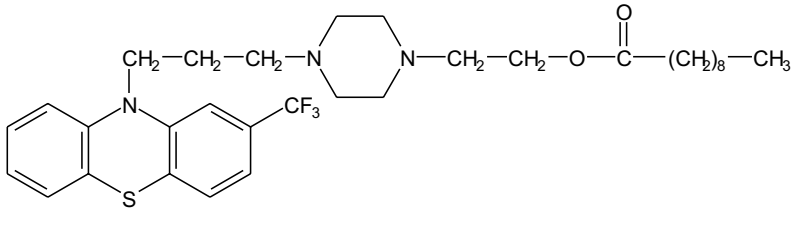


C. (*RS*)-methyl-[3-fenyl-3(3-trifluormethylfenoxy)propyl]amin.

† Fluphenazini decanoas

Flufenazindekanoat

Synonymum. Fluphenazinum decanoicum



$C_{32}H_{44}F_3N_3O_2S$ M_r 591,77 CAS 5002-47-1

Je to 2-{4-[3-(2-trifluormethyl-10-fenothiazinyl)propyl]-1-piperazinyl}ethyldekanoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{32}H_{44}F_3N_3O_2S$.

Vlastnosti

Světle žlutá viskózní kapalina nebo žlutá hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, v ethanolu a v etheru, snadno rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 260 nm a ploché absorpční maximum při asi 310 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je 570 až 630.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *flufenazindekanoatu CRL*. Měří se tablety připravené odděleně nanesením 50 μl roztoků látek (25 g/l) v *dichlormethanu R* na tablety *bromidu draselného R*. Tablety se suší před zkouškou 1 h při 60 °C.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*. Suchá vrstva se celá impregnuje v komoře vyvíjením roztokem *tetradekanu R* 5% *(V/V)* v *heptanu R* a nechá se usušit.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *flufenazindekanoatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *flufenazinenantatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do vzniku bezbarvého roztoku. Zfiltruje se a k filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanoxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvení roztoku s kontrolním roztokem připraveným současně stejným způsobem; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

E. Nevyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují bezprostředně před použitím.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, cyklohexanu R* a *acetonu R* (5 + 30 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Potom se vrstva postříká roztokem *kyseliny sírové R* 50% *(V/V)* a zahřívá se 15 min při 100 °C. Hodnoceno při obou detekcích, žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru do změny fialového zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,59 mg $C_{32}H_{44}F_3N_3O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

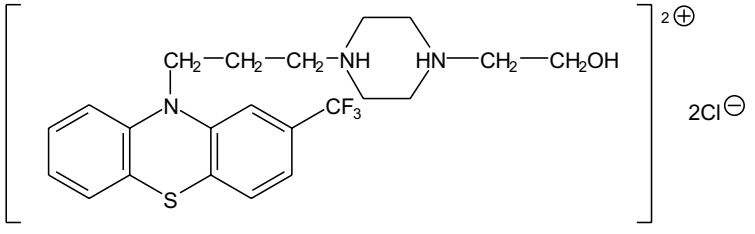
A. flufenazin,

B. flufenazin-S-oxid.

† Fluphenazini dihydrochloridum

Flufenaziniumdichlorid

Synonymum. Fluphenazini hydrochloridum



$C_{22}H_{28}Cl_2F_3N_3OS$ M_r 510,44 CAS 146-56-5

Je to {4-[3-(2-trifluormethyl-10-fenothiazinyl)propyl]-1-(2-hydroxyethyl)piperaziniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{28}Cl_2F_3N_3OS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v dichlormethanu a v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 260 nm a ploché absorpční maximum při asi 310 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je 630 až 700.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *flufenaziniumdichloridu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *flufenaziniumdichloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *perfenazinu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se dvakrát směsí objemových dílů *vody R, diethylaminu R* a *2-butanonu R* (1 + 4 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

D. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R,* 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do vzniku bezbarvého roztoku. Zfiltruje se a k filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS.* Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvení roztoku s kontrolním roztokem připraveným současně stejným způsobem; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (2.2.3). 1,9 až 2,4; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují bezprostředně před použitím.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, *diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší 3 h v sušárně při 65 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,220 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a 40 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,52 mg $C_{22}H_{28}Cl_2F_3N_3OS$.

Uchovávání

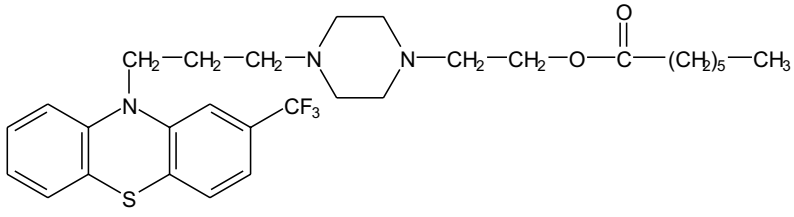
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. flufenazin-S-oxid.

† Fluphenazini enantas

Flufenazinenantat



$C_{29}H_{38}F_3N_3O_2S$ M_r 549,69 CAS 2746-81-8

Je to 2-{4-[3-(2-trifluormethyl-10-fenothiazinyl)propyl]-1-piperazinyl}ethylheptanoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{29}H_{38}F_3N_3O_2S$.

Vlastnosti

Světle žlutá viskózní kapalina nebo žlutá hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, v ethanolu a v etheru, snadno rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 260 nm a ploché absorpční maximum při asi 310 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je 610 až 670.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *flufenazinenantatu CRL*. Měří se tablety připravené odděleně nanesením 50 μl roztoků látek (25 g/l) v *dichlormethanu R* na tablety *bromidu draselného R*. Tablety se suší před zkouškou 1 h při 60 °C.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*. Suchá vrstva se celá impregnuje v komoře vyvíjením roztokem *tetradekanu R* 5% *(V/V)* v *heptanu R* a nechá se usušit.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *flufenazinenantatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *flufenazindekanoatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 5 mg se smíchá s 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R,* 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do vzniku bezbarvého roztoku. Zfiltruje se a k filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnanoxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvení roztoku s kontrolním roztokem připraveným současně stejným způsobem; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

E. Nevyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují bezprostředně před použitím.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, cyklohexanu R* a *acetonu R* (5 + 30 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Potom se vrstva postříká roztokem *kyseliny sírové R* 50% *(V/V)* a zahřívá se 15 min při 100 °C. Hodnoceno při obou detekcích, žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru do změny fialového zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,49 mg $C_{29}H_{38}F_3N_3O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

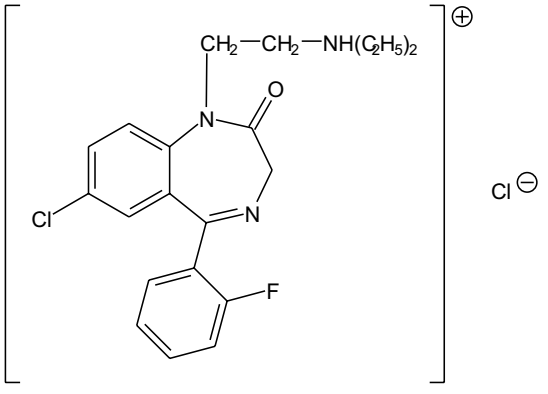
Nečistoty

A. flufenazin,
B. flufenazin-S-oxid.

§ Flurazepami hydrochloridum

Flurazepamiumchlorid

Synonymum. Flurazepami hydrochloridum



$C_{21}H_{24}Cl_2FN_3O$ M_r 424,34 CAS 36105-20-1

Je to N,N-diethyl-N-{2-[5-(2-fluorfenyl)-2,3-dihydro-7-chlor-2-oxo-1*H*-1,4-benzodiazepinyl]--ethyl}amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{24}Cl_2FN_3O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Hodnota pH, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 0,10 g se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* 2,7% *(V/V)* v *methanolu bezvodém R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 240 nm a 284 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 240 nm k absorbanci naměřené při 284 nm je 2,15 až 2,25.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *flurazepamiumchloridu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *flurazepamiumchloridu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *flurazepamiumchloridu CRL* a 10 mg *diazepamu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *etheru R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

E. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se zchladnout, přidá se 1 ml *vody R,* 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a tolik *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* (asi 1 ml), až vznikne bezbarvý roztoku. Zfiltruje se a 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS.* Promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se zbarvení roztoku s kontrolním roztokem připraveným stejným způsobem. Zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je oranžově červený.

F. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 6,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) na 50 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *etheru R* (2,5 + 97,5) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Fluoridy *(2.4.5).* 0,10 g vyhovuje limitní zkoušce na fluoridy (500 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R.* 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

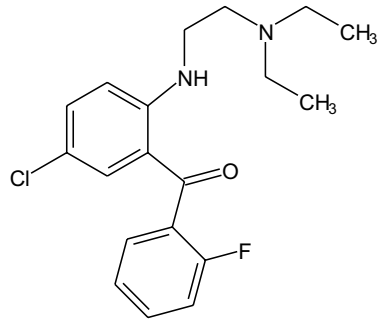
0,350 g se rozpustí ve směsi 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 42,43 mg $C_{21}H_{24}Cl_2FN_3O$.

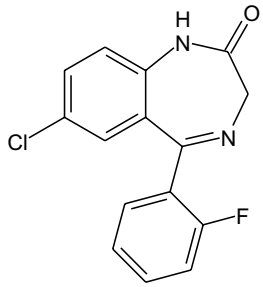
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

Nečistoty



A. 5-chlor-2-(2-diethylaminoethylamino)-2′-fluorbenzofenon,



B. 7-chlor-5-(2-fluorfenyl)-2,3-dihydro-1*H*-1,4-benzodiazepin-2-on.

Foeniculi amari fructus

Fenyklový plod hořký

Synonymum. Fructus foeniculi amari

Je to usušená dvojnažka a nažka druhu *Foeniculum vulgare* MILLER subsp. *vulgare,* var. *vulgare.*
Obsahuje nejméně 40 ml silice v kilogramu drogy, počítáno na sušinu. Silice obsahuje nejméně 60,0 % anetholu a nejméně 15,0 % fenchonu.

Vlastnosti

Droga ostré chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Jsou to dvojnažky téměř válcovitého tvaru s okrouhlou bází a užším vrcholem, s velkým stylopodiem. Většinou jsou 3 mm až 12 mm dlouhé a 3 mm až 4 mm široké. Nažky, obvykle jednotlivé, jsou lysé. Každá má pět vyčnívajících, lehce rýhovaných žeber. Na příčném řezu mohou být pod lupou patrny čtyři kanálky na straně dorzální a dva na straně poutcové.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý až šedožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: žluté úlomky širokých sekrečních kanálků, tvořené mnohohrannými sekrečními buňkami se žlutohnědými stěnami často provázenými vrstvou tenkostěnných, mnohohranných, příčně protáhlých buněk 2 μm až 9 μm širokých, které jsou parketovitě uspořádány. Síťovitý parenchym mezokarpu; četné svazky vláken ze žeber často provázené úzkými šroubovitě ztlustlými cévami; velmi četné úlomky endospermu obsahující aleuronová zrna a velmi malé drúzy šťavelanu vápenatého, někdy také svazky vláken karpoforu.

C. Provede se tenkovrstvá chromatogafie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,3 g čerstvě práškované drogy (1400) se protřepává 15 min s 5,0 ml *dichlormethanu R*. Zfiltruje se, filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni při 60 °C a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 50 μl *anetholu R* a 10 μl *fenchonu R* se rozpustí v 5,0 ml *hexanu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *hexanu R* a *toluenu R* (20 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku je ve střední části patrna skvrna odpovídající anetholu. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou R* a suší se 5 min až 10 min při 140 °C, dokud se v dolní třetině chromatogramů neobjeví žlutá skvrna odpovídající fenchonu. Skvrna anetholu je zbarvena fialově. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní třetině červenohnědá skvrna (terpeny).

Zkoušky na čistotu

Estragol. Silice ze zkoušky Stanovení obsahu obsahuje nejvýše 5,0 % estragolu. Provede se způsobem uvedeným ve zkoušce Stanovení obsahu anetholu a fenchonu.

Porovnávací roztok. 5 mg *estragolu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylenu R*.

Obsah estragolu v procentech se vypočítá metodou vnitřní normalizace.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1,5 % stopek a nejvýše 1,5 % ostatních cizích příměsí.

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 20,0 g práškované drogy (710).

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Stanovení obsahu

Silice. Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). Droga se rozdrtí na hrubý prach (1400), 5,0 g se ihned použije ke stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v baňce na 500 ml s 200 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

Anethol a fenchon. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. Směs silice a *xylenu R* ze zkoušky Stanovení silic v rostlinných drogách se zředí *xylenem R* na 5,0 ml a roztok se vypustí z přístroje pro stanovení silic.
Porovnávací roztok. 5 mg *fenchonu R* a 5 mg *anetholu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylenu R.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony délky 30 m až 60 m a vnitřního průměru 0,3 mm s vnitřní stěnou pokrytou *makrogolem 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 0,40 ml/min,
- dělicího poměru 1/200,
- plamenoionizačního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 4 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min až na 170 °C, při níž se udržuje 15 min. Teplota nástřikového prostoru se udržuje na 220 °C a detektoru na 270 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Při dodržení předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku. Obsah anetholu a fenchonu v procentech se vypočítá metodou vnitřní normalizace.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Foeniculi dulcis fructus

Fenyklový plod sladký

Synonymum. Fructus foeniculi dulcis

Je to usušená dvojnažka a nažka druhu *Foeniculum vulgare* MILLER, spp. *vulgare* var. *dulce* (MILLER) THELLUNG. Obsahuje nejméně 20 ml silice v 1 kilogramu drogy, počítáno na sušinu. Silice obsahuje nejméně 80,0 % anetholu.

Vlastnosti

Droga má sladkou chuť.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Jsou to dvojnažky téměř válcovitého tvaru s okrouhlou bází a užším vrcholem, s velkým stylopodiem. Většinou jsou 3 mm až 12 mm dlouhé a 3 mm až 4 mm široké. Nažky, obvykle jednotlivé, jsou lysé. Každá má pět vyčnívajících, lehce rýhovaných žeber. Na příčném řezu mohou být pod lupou patrny čtyři kanálky na straně dorzální a dva na straně poutcové.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý až šedožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: žluté úlomky širokých sekrečních kanálků, tvořené mnohohrannými sekrečními buňkami se žlutohnědými stěnami,

často provázenými vrstvou tenkostěnných, mnohohranných, příčně protáhlých buněk 2 μm až 9 μm širokých, které jsou parketovitě uspořádány. Síťovitý parenchym mezokarpu; četné svazky vláken ze žeber často provázené úzkými šroubovitě ztlustlými cévami; velmi četné úlomky endospermu obsahující aleuronová zrna a velmi malé drúzy šťavelanu vápenatého, někdy také svazky vláken karpoforu.

C. Provede se tenkovrstvá chromatogafie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,3 g čerstvě práškované drogy (1400) se 15 min protřepává s 5,0 ml *dichlormethanu R.* Zfiltruje se a filtrát se opatrně odpaří do sucha na vodní lázni při 60 °C. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R.*

Porovnávací roztok. 60 μl *anetholu R* se rozpustí v 5,0 ml *hexanu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *hexanu R* a *toluenu R* (20 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku je ve střední části patrna skvrna odpovídající anetholu. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou R,* suší se 5 min při 140 °C a pozoruje se v denním světle. Skvrna anetholu je zbarvena fialově. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je v horní třetině patrna červenohnědá skvrna (terpeny).

Zkoušky na čistotu

Estragol a fenchon. Silice ze zkoušky Stanovení obsahu obsahuje nejvýše 10,0 % estragolu a nejvýše 7,5 % fenchonu. Provede se způsobem uvedeným ve zkoušce Stanovení obsahu anetholu.

Porovnávací roztok. 5 mg *estragolu R* a 5 mg *fenchonu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylenu R.*

Obsah estragolu a fenchonu v procentech se vypočítá metodou vnitřní normalizace.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1,5 % stopek a nejvýše 1,5 % ostatních cizích příměsí.

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 20,0 g práškované drogy (710).

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Stanovení obsahu

Silice. Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). Droga se rozdrtí na hrubý prach (1400), 10,0 g se ihned použije ke stanovení. Destiluje se 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v baňce na 500 ml s 200 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Anethol. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. Směs silice a *xylenu R* ze zkoušky Stanovení silic v rostlinných drogách se zředí *xylenem R* na 5,0 ml a roztok se vypustí z přístroje pro stanovení silic.

Porovnávací roztok. 5 mg *anetholu R* se rozpustí v 0,5 ml *xylenu R.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kapilární kolony délky 30 m až 60 m a vnitřního průměru 0,3 mm s vnitřní stěnou pokrytou *makrogolem 20 000 R,*
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 0,40 ml/min,
- dělicího poměru 1/200,
- plamenoionizačního detektoru,

- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 4 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min až na 170 °C, při níž se udržuje 15 min. Teplota nástřikového prostoru se udržuje na 220 °C a detektoru na 270 °C.

Nastříkne se po 1 μl obou roztoků. Obsah anetholu v procentech se vypočítá metodou vnitřní normalizace.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Foeniculi etheroleum

N

Fenyklová silice

Synonyma: Foeniculi aetheroleum, Oleum foeniculi

Je to silice získaná ze zralých plodů druhu *Foeniculum vulgare* MILL. var. *vulgare* destilací s vodní parou.

Vlastnosti

Bezbarvá až slabě nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu, zprvu nasládlé, později hořké chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, etherem a mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *anetholu R*, 0,1 g *anisaldehydu R* a 50 mg *fenchonu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C. Ještě horká vrstva se postříká roztokem *manganistanu draselného R* (35 g/l) v *kyselině sírové R* a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,961 až 0,972 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,528 až 1,548.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +11° až +24°.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. +5 °C až +10 °C.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Nejvýše 8,0 %.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná v jednom objemovém dílu *lihu R* 90% *(V/V)*.

Fenoly. 1 ml se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* nevznikne modrofialové zbarvení.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Formaldehydi solutio 35%

Roztok formaldehydu 35%

Synonyma. Solutio formaldehydi, Formaldehydum solutum

Je to roztok formaldehydu (CH_2O; M_r 30,03) stabilizovaný přísadou methanolu. Obsahuje 34,5 % až 38,0 % sloučeniny CH_2O.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina. Je mísitelný s vodou a s lihem 96%. Při uchovávání se může zakalit.

Zkoušky totožnosti

A. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 10 ml. K 0,05 ml roztoku se přidá 1 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (15 g/l), 2 ml *vody R* a 8 ml *kyseliny sírové R;* do 5 min vznikne fialově modré nebo fialově červené zbarvení.

B. K 0,1 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody R* a 2 ml čerstvě připraveného roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l), 1 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R;* vznikne intenzivní červené zbarvení.

C. 0,5 ml se ve zkumavce smíchá s 2 ml *vody R,* přidají se 2 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a *amoniak zředěný RS2* do slabě alkalické reakce. Zahřeje se na vodní lázni; vznikne šedá sraženina nebo stříbrné zrcátko na stěnách zkumavky.

D. Zkouška stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 ml, pokud je potřeba, se zfiltruje a zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Methanol. 9,0 % až 15,0 % *(V/V);* stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *ethanolu R1* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 10 ml *ethanolu R1* se zředí *vodou R* na 100 ml.
Zkoušený roztok. K 10,0 ml se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. K 1,0 ml *methanolu R* se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m až 2,0 m a vnitřního průměru 2 mm až 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml až 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C, teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 150 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Upraví se citlivost detektoru tak, aby výška píků na chromatogramu nebyla menší než 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími methanolu a ethanolu není menší než 2,0. Odděleně se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku. Obsah methanolu se vypočítá v procentech.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Do odměrné baňky na 100 ml obsahující 2,5 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se odváží 1,000 g zkoušené látky, promíchá se a zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml roztoku se přidá 30,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS*, 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a promíchá se. Po 15 min se přidá 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 2 ml *škrobu RS* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 1,501 mg CH_2O.

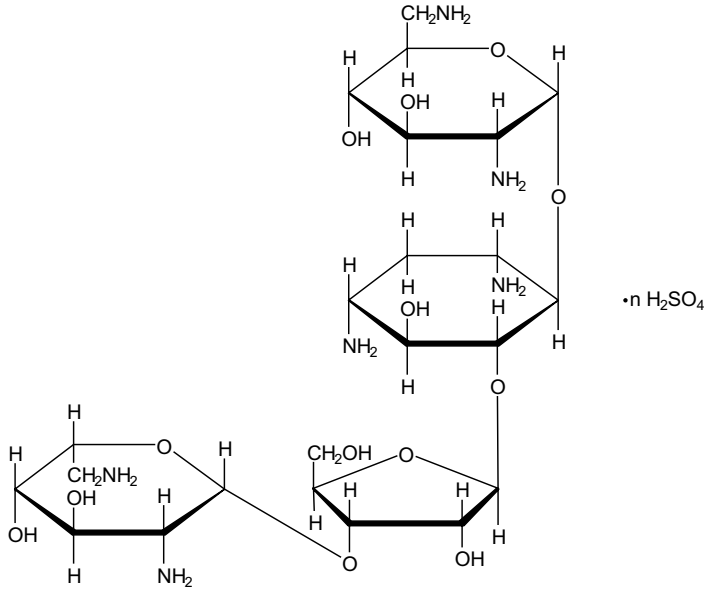
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při 15 °C až 25 °C.

† Framycetini sulfas

Framycetiniumsulfat

Synonymum. Neomycin B-sulfat



$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$. nH_2SO_4 CAS 28002-70-2

M_r 614,65 (báze)

Je to O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-α-D-glukopyranosyl-(1→4)-O-[O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-ß-L-idopyranosyl-(1→3)-ß-D-*ribo*furanosyl-(1→5)]-2-deoxy-D-streptamoniumsulfat, produkovaný vybranými kmeny *Streptomyces fradiae* nebo *Streptomyces decaris* nebo se získává jiným způsobem.

Počítáno na vysušenou látku, účinnost je nejméně 630 m.j v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpusný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Neomycin C, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3)*. 6,0 až 7,0. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +52,5° až +55,5°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Obsah alkoholů. Nejvýše 2 %, počítáno jako methanol. 0,200 g (*m* g) se převede do malého destilačního přístroje. Rozpustí se v 5 ml *vody R* a přidá se 0,05 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*. Destiluje se a do 10ml odměrného válečku se zachytí asi 2,5 ml destilátu. Přelije se do kuželové baňky a váleček se vypláchne dvakrát 1 ml *vody R*. Přidá se 25,0 ml *dichromanu draselného 0,0167 mol/l VS* obsahujícího 40 % (*V/V*) *kyseliny sírové R*. Zahřívá se 30 min na vodní lázni, zchladí se, převede do kuželové baňky na 750 ml a zředí *vodou R* na 500 ml. Přidá se 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l). Po 5 min se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za přidání *škrobu RS* ke konci titrace. Titruje se z tmavě modrého zbarvení do bledě zeleného (spotřeba n_1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*). Současně se provede slepá zkouška s 5 ml *vody R* (spotřeba n_2 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*).

Obsah alkoholů v procentech vyjádřený jako CH_3OH se vypočítá ze vzorce:

$$0{,}0534\frac{(n_2 - n_1)}{m} .$$

Neamin. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 0,250 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 mg *neaminu CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (b). Smíchá se 0,5 ml zkoušeného roztoku s 0,5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně v 5mm proužcích po 5 μl každého roztoku. Proužky se vysuší a vyvíjí se směsí objemových dílů *dichlormethanu R, amoniaku 26 % R* a *methanolu R* (10 + 20 + 30) po dráze nejméně 8 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C, postříká se *zkoumadlem ninhydrinovým s chloridem cínatým R* a 15 min se zahřívá při 110 °C. Potom se vrstva znovu postříká stejným zkoumadlem a zahřívá se 15 min při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže jsou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Neomycin C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *framycetiniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *framycetiniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 40 mg *neomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně v 5mm proužcích po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *chloridu sodného R* (200 g/l) (20 + 80) po dráze nejméně 12 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrna odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně získané na porovnávacím roztoku (a); skvrna neomycinu C s hodnotou R_F o málo nižší, než je hodnota R_F hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je patrná skvrna s hodnotou R_F o málo nižší, než je hodnota R_F hlavní skvrny.

Sírany. 27,0 % až 31,0 % (SO_4), počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a *amoniakem 26% R* se upraví pH roztoku na 11. Přidá se 10,0 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *ftaleinpurpuru R* a titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se

začíná barva roztoku měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud nezmizí fialově modré zbarvení.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 8,0 %; 1,00 g se suší 3 h nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a tlaku nepřesahujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k zavádění do tělních dutin bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k zavádění do tělních dutin bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogeny, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 16 mg zkoušené látky rozpuštěné v 5 ml *vody na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití *framycetiniumsulfatu CRL*.

Uchovávání

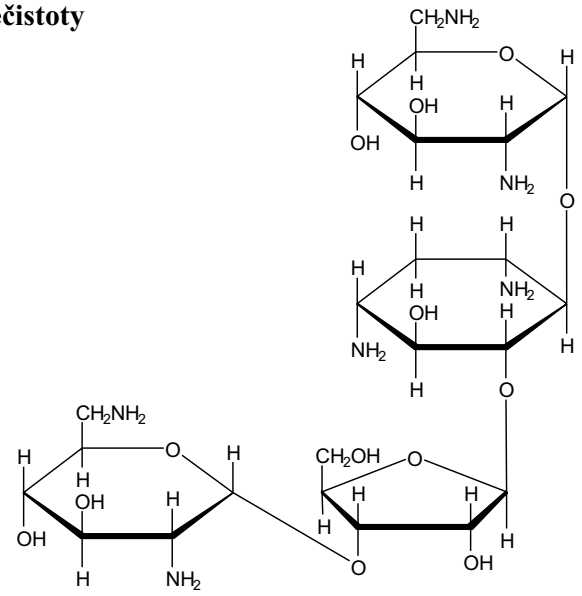
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Pokud je látka určena k podání do tělních dutin, uchovává se ve vzduchotěsných sterilních zabezpečených obalech.

Separandum.

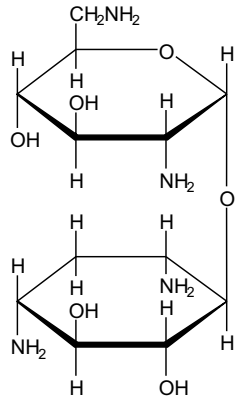
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka určena do tělních dutin.

Nečistoty



A. neomycin C,



B. neamin.

Frangulae cortex

1998

Krušinová kůra

Synonyma. Cortex frangulae, Cortex rhamni frangulae

Je to usušená kůra nebo její úlomky z kmenů a větví *Rhamnus frangula* L. (*Frangula alnus* MILL.).

Obsahuje nejméně 7,0 % glukofrangulinů, počítáno jako glukofrangulin A ($C_{27}H_{30}O_{14}$; M_r 578,5), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Zprohýbané, většinou ploché nebo svinuté úlomky nebo jednoduché až dvojité rourkovité kousky obvykle 0,5 mm až 2 mm silné, proměnlivé délky a šířky. Na zevní straně šedohnědé nebo tmavohnědé, podélně svraštělé, s četnými našedlými, příčně protáhlými lenticelami, po odstranění zevních vrstev je kůra tmavě červená. Vnitřní strana oranžově hnědá až červenohnědá, hladká, s jemným podélným rýhováním. Alkalickými roztoky se barví červeně. Lom krátký, na vnitřní straně vláknitý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je nažloutlý až červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné svazky lýkových vláken, částečně zdřevnatělých, provázených komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého; červenohnědé úlomky korku; úlomky parenchymu obsahující drúzy šťavelanu vápenatého. Sklereidy chybějí.

C. Zkouška Jiné druhy rodu *Rhamnus*, anthrony, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti. Chromatogram se pozoruje v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku

jsou v dolní třetině dvě oranžově hnědé skvrny (glukofranguliny) a v horní třetině dvě až čtyři skvrny (franguliny, skvrny nejsou vždy zřetelně oddělené a nad nimi frangulaemodin).

D. Asi 50 mg práškované drogy (180) se smíchá s 25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a směs se zahřívá 15 min na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 20 ml *etheru R*, vodná vrstva se odstraní. Etherová vrstva se protřepe 10 ml *amoniaku zředěného RS1;* vodná vrstva se zbarví červenofialově.

Zkoušky na čistotu

Jiné druhy rodu *Rhamnus*, anthrony. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. K 0,5 g práškované drogy (180) se přidá 5 ml *lihu R* 70% (*V/V*) a zahřeje se k varu. Po ochlazení se odstřeďuje. Supernatantní tekutina se ihned slije a použije se nejpozději do 30 min.

Porovnávací roztok. 20 mg *aloinu R* se rozpustí v *lihu R* 70% (*V/V*) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (13 + 17 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min a pak se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) a suší se 15 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části patrna hnědožlutá skvrna odpovídající aloinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrna žádná skvrna fluoreskující intenzivně žlutě nebo skvrna odpovídající polohou skvrně aloinu na chromatogramu porovnávacího roztoku a fluoreskující oranžově až načervenale.

Na další vrstvu se nanese do pruhu 10 μl zkoušeného roztoku a postupuje se výše uvedeným způsobem. Vrstva se suší nejvýše 5 min, ihned se postříká roztokem *modři nitrotetrazoliové R* (5 g/l) v *methanolu R* a chromatogram se ihned pozoruje. Na chromatogramu nejsou žádné fialové nebo šedomodré skvrny.

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Nejvýše 1 %.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 6,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

0,250 g práškované drogy (180) se odváží do předem zvážené baňky s kulatým dnem a se zábrusovou zátkou. Přidá se 25,0 ml *methanolu R* 70% *(V/V)*, promíchá se, a znovu se zváží. Zahřívá se 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem, po ochlazení se zváží a doplní se *methanolem R* 70% *(V/V)* na původní hmotnost. Pak se zfiltruje, 5,0 ml filtrátu se převede do dělicí nálevky, přidá se 50 ml *vody R* a 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Protřepe se pětkrát 20 ml *etheru petrolejového R*. Po oddělení vrstev se vodná vrstva převede do 100ml odměrné baňky. Spojené vrchní vrstvy se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*. Promývací tekutina se spojí s vodnou vrstvou v odměrné baňce. Přidá se 5 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (50 g/l) a zředí se *vodou R* na 100 ml. Vrstva petrolejového etheru se odstraní. 40,0 ml vodného roztoku se převede do 200ml baňky s kulatým dnem a se zábrusovou zátkou. Přidá se 20 ml roztoku *chloridu železitého R* (200 g/l) a zahřívá se 20 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni tak, aby hladina vody přesaho-

vala hladinu tekutiny v baňce. Přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se dalších 20 min za častého protřepávání, až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml *etheru R*, ether se vždy nejprve použije k promytí baňky. Spojené etherové vrstvy se promyjí dvakrát 15 ml *vody R,* převedou se do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R.*

Změří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se procentuální obsah glukofrangulinů, počítáno jako glukofrangulin A ($C_{27}H_{30}O_{14}$), podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 3{,}06}{m} ,$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,
m - navážku drogy v gramech.

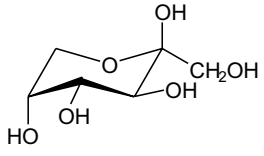
Specifická absorbance glukofrangulinu A má hodnotu 204.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Fructosum

Fruktosa



$C_6H_{12}O_6$ M_r 180,16 CAS 57-48-7

Je to β-D-fruktopyranosa. Látka popsaná v tomto článku není nutně vhodná pro parenterální použití.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, intenzivně sladké chuti. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *fruktosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *fruktosy CRL*, 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené body se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15+ 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla musí být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi 5 ml *kyseliny sírové R* a 95 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

B. 0,1 g se rozpustí ve 10 ml *vody R*, přidají se 3 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

C. 1 ml roztoku S viz, Zkoušky na čistotu, se smíchá s 9 ml *vody R.* K 1 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřeje se na 70 °C; vzniká hnědé zbarvení.

D. 5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se smíchá s 0,2 g *resorcinolu R* a 9 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné R* a zahřívá se 2 min na vodní lázni; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a po přidání 10 ml *vody R* je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 6,0 g se rozpustí ve 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -91,0° až -93,5°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený takto: 10,0 g se rozpustí v 80 ml *vody R* a přidá se 0,2 ml *amoniaku zředěného RS1*, 30 min se nechá stát a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Cizí cukry. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. 1 ml roztoku se smíchá s 9 ml *lihu 96% R*, případně vzniklá opalescence není intenzivnější než opalescence směsi 1 ml původního roztoku a 9 ml *vody R.*

5-Hydroxymethylfurfural a příbuzné látky. 5 ml roztoku S se smíchá s 5 ml *vody R.* Absorbance *(2.2.25)* roztoku měřená v maximu při 284 nm není vyšší než 0,32.

Baryum. 10 ml roztoku S se smíchá s 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Pozoruje se ihned a pak po 1 h. Roztok vyhovuje zkoušce, jestliže není případně vzniklá opalescence intenzivnější než opalescence směsi 1 ml *vody destilované R* a 10 ml roztoku S.

Olovo v cukrech *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce na olovo v cukrech (0,5 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

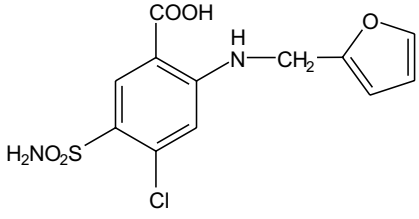
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %. 5,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Furosemidum

Furosemid



$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ M_r 330,74 CAS 54-31-9

Je to kyselina 4-chlor-N-furfuryl-5-sulfamoylanthranilová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru a prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při teplotě asi 210 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50 mg se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a zředí se jím na 100 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *hydroxidu sodného R* (4 g/l) na 100 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 228 nm, 270 nm a 333 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 270 nm k absorbanci naměřené v maximu při 228 nm je 0,52 až 0,57.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *furosemidu CRL*.

C. Asi 25 mg se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*. K 5 ml roztoku se přidá 10 ml *vody R*. K 0,2 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vaří se 15 min pod zpětným chladičem. Nechá se zchladnout a přidá se 18 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1 ml roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l). Nechá se stát 3 min, přidají se 2 ml roztoku *kyseliny amido-*

sírové R (25 g/l) a promíchá se. Přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l); vzniká fialově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29). Roztoky se připraví bezprostředně před použitím a chrání se před světlem.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *furosemidu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku a 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchají a zředí se mobilní fází na 20,0 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je roztok připravený následovně: 0,2 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 0,25 g *cetrimidu R* se rozpustí v 70 ml *vody R*, pH se upraví *amoniakem 17,5% R* na hodnotu pH 7,0 a přidá se 30 ml *1-propanolu R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 238 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou píků nebyly menší než 20 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (furosemid nečistota A) a druhým píkem (furosemid) je nejméně 4.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a zaznamenává se chromatogram po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha prvního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech těchto píků, kromě hlavního píku, není větší než 2násobek plochy prvního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy prvního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Chloridy *(2.4.4)*. K 0,5 g se přidá směs 0,2 ml *kyseliny dusičné R* a 30 ml *vody R*, třepe se 5 min, nechá se 15 min stát a potom se zfiltruje. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 µg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 1,0 g se přidá směs 0,2 ml *kyseliny octové R* a 30 ml *vody destilované R,* třepe se 5 min, nechá se 15 min stát a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 µg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se zahřívá v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 20 ml *dimethylformamidu R*, přidá se 0,2 ml *modři bromthymolové RS2* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,07 mg $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. kyselina 2-chlor-4-(furfurylamino)-5-sulfamoylbenzoová,
B. kyselina 2,4-dichlor-5-sulfamoylbenzoová,
C. kyselina 2-amino-4-chlor-5-sulfamoylbenzoová,
D. kyselina 2,4-bis(furfurylamino)-5-sulfamolybenzoová.

1740

Galla

N

Duběnka

Je to usušená hálka tvořící se na pupenech druhu *Quercus infectoria* OLIVIER po bodnutí a uložení vajíček *Cynips tinctoria* HARTG. Obsahuje nejméně 20,0 % tříslovin.

Vlastnosti

Droga bez pachu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Hálka kulovitá až hruškovitá, o průměru až 2,5 cm, naspodu zúžená v krátkou silnou stopku, nahoře nepravidelně hrbolatá, lysá, šedozelená, hnědá nebo nažloutlá, velmi tvrdá a poměrně těžká. Uprostřed hálky je zpravidla dutina kulovitého tvaru, o průměru 5 mm až 7 mm, v níž mohou být zbytky mrtvého hmyzu. Je-li dutina prázdná, je spojena s povrchem hálky asi 3 mm dlouhou chodbičkou. Lom zrnitý až paprsčitý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý až žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky parenchymu; krystaly a drúzy šťavelanu vápenatého; hrudky tříslovin a hroznovité útvary ligninu; škrobová zrna, hnědě zbarvené sférokrystaly; úlomky sklerenchymu s buňkami silně ztlustlými, hrubě tečkovanými; zřídka cévy jednotlivé nebo ve skupinách.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (710) se smíchá s 10 ml *lihu R* 60% *(V/V)* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 30 mg *taninu R* a 10 mg *kyseliny gallové R* se rozpustí v 10,0 ml *acetonu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrné dvě modré skvrny, v dolní části (tanin) a v horní části (kyselina gallová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná řada modrých skvrn; v dolní části chromatogramu dvě skvrny, v poloze vymezené skvrnou taninu na chromatogramu porovnávacího roztoku další dvě, v horní části chromatogramu jedna skvrna odpovídá polohou a zbarvením skvrně kyseliny gallové na chromatogramu porovnávacího roztoku a těsně nad ní je další modrá skvrna.

D. 0,1 ml zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti C se smíchá se 100 ml *vody R* a 0,1 ml roztoku *chloridu železitého R* (100 g/l) v *lihu 96% R;* vznikne tmavě modré zbarvení.

E. 1 ml zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti C se smíchá se 2 ml roztoku *vanilinu R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R;* vznikne žlutohnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %. 2,000 g práškované drogy se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 1,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

0,100 g práškované drogy (710) se v kuželové baňce smíchá se 150 ml *vody R*. Zahřeje se k varu a zahřívá se dalších 30 min ve vodní lázni. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 250 ml. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje filtračním papírem o průměru 12 cm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Celkové polyfenoly. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a 17,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (380 g/l). Přesně po 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 750 nm (A_1) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neadsorbovatelné na kožní prášek. K 10,0 ml filtrátu se přidá 0,10 g *kožního prášku CRL* a 60 min se intenzivně protřepává, pak se zfiltruje. 2,0 ml filtrátu se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a 17,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (380 g/l). Přesně po 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 750 nm (A_2) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *pyrogallolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a 17,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (380 g/l). Přesně 2 min po přidání posledního roztoku a do 15 min po rozpuštění pyrogallolu se měří absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 750 nm (A_3) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{3{,}125 \ . \ (A_1 - A_2)}{A_3 \ . \ m},$$

v němž značí:
m - navážku drogy v gramech.

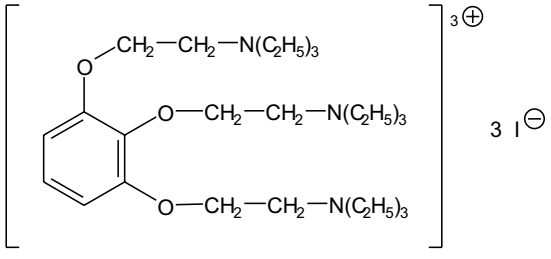
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Gallamini triethiodidum

Gallaminiumtriethojodid

Synonyma. Gallaminium triethoiodatum, Gallaminium triaethoiodatum, triethojodid gallaminia



$C_{30}H_{60}I_3N_3O_3$ M_r 891,54 CAS 65-29-2

Je to N,N′,N″-(1,2,3-benzentriyltrioxytriethylen)tris(triethylamonium)trijodid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{30}H_{60}I_3N_3O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS*. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 225 nm. Specifická absorbance naměřená v maximu je 500 až 550.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* látky se shoduje se spektrem *gallaminiumtriethojodidu CRL.*

C. K 5,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného RS;* vznikne žlutá sraženina.

D. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 2 ml a přidá se 0,2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na jodidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,6 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 30 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a ihned po přípravě není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml *vody R* se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS*. Přidává se buď *kyselina sírová 0,01 mol/l VS*, nebo *hydroxid sodný 0,02 mol/l VS* do vzniku oranžově žlutého zabarvení roztoku. Potom se přidá 1,0 g zkoušené látky a protřepáním se rozpustí.

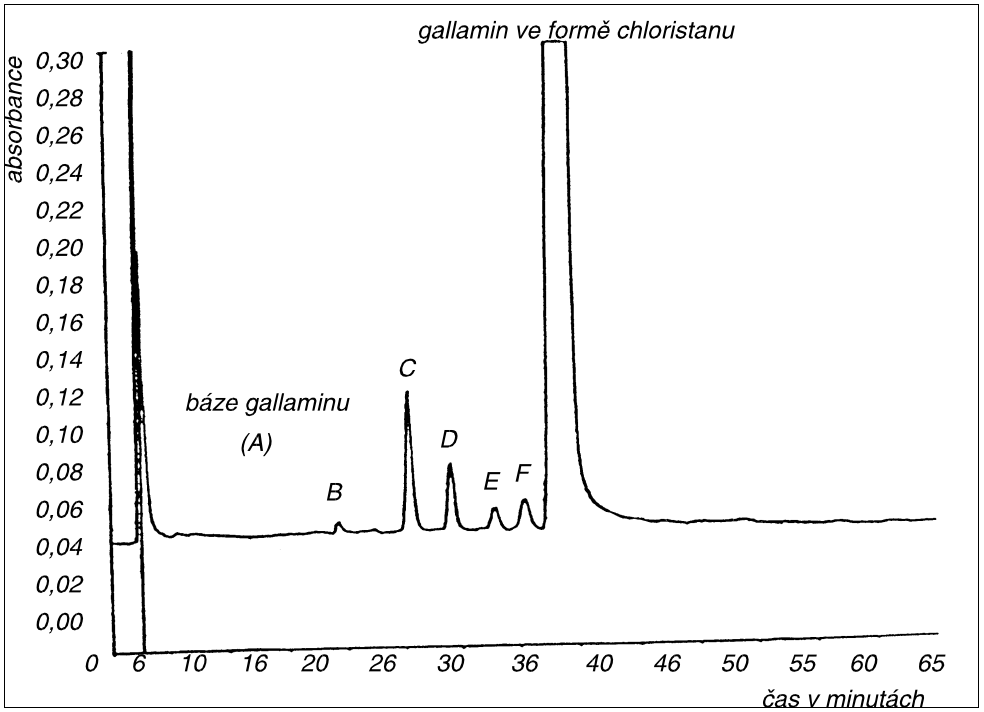
Ke vzniku původního oranžově žlutého zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny sírové 0,01 ml/l VS* nebo 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 30,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je roztok připravený následovně: 14 g *chloristanu sodného R* se rozpustí v 850 ml *tlumivého roztoku o pH 3,0* a přidá se 150 ml *methanolu R.* Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 205 nm.

Když jsou chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, jsou relativní retenční časy vztažené ke gallaminu jako chloristanu (asi 40 min) následující: gallamin nečistota A asi 0,45; gallamin nečistota B asi 0,50; gallamin nečistota C asi 0,65; gallamin nečistota D asi 0,75; gallamin nečistota E asi 0,85 a gallamin nečistota F asi 0,90, viz obrázek vzorového chromatogramu.



Obr. 1. Vzorový chromatogram

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času gallaminu jako chloristanu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %); součet ploch všech těchto píků není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (2,0 %). Nepřihlíží se k píku jodidu s retenčním časem 0.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,270 g se rozpustí ve směsi 15 ml *octanu rtuťnatého RS* a 40 ml *acetonu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,72 mg $C_{30}H_{60}I_3N_3O_3$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. 1,2,3-tris[2-(diethylamino)ethoxy]benzen (báze gallaminu),
B. 1,3-bis[2-(triethylamonio)ethoxy]-2-[2-(triethylmethylamonio)ethyl]benzentrijodid,
C. 1,3-bis[2-(triethylamonio)ethoxy]-2-[2-(diethylmethylamonio)ethoxy]benzentrijodid,
D. 1,2-bis[2-(triethylamonio)ethoxy]-3-[2-(diethylmethylamonio)ethoxy]benzentrijodid,
E. 1,2-bis[2-(triethylamonio)ethoxy]-3-[2-(diethylamino)ethoxy]benzendijodid,
F. 1,2,3-tris[2-(triethylamonio)ethoxy]-4-[2-(triethylamonio)ethyl]benzentetrajodid.

Gelatina

Želatina

Je to čištěná bílkovina získaná z živočišného kolagenu buď částečnou kyselou hydrolýzou (typ A), nebo částečnou zásaditou hydrolýzou (typ B); může to být i směs obou typů. Látka popsaná v tomto článku není zcela vhodná k přípravě parenterálních lékových forem nebo pro některé další účely.

Vlastnosti

Nažloutlá až světle jantarová pevná látka, bez chuti, obyčejně ve formě lístků, útržků, zrn nebo prášku. Je prakticky nerozpustná v běžných organických rozpouštědlech; ve studené vodě bobtná, po zahřátí tvoří koloidní roztok, který po ochlazení přechází ve více nebo méně pevný gel. Izoelektrický bod želatiny typu A je mezi pH 6,3 a 9,2, želatiny typu B mezi pH 4,7 a 5,2.

Zkoušky totožnosti

A. 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se smíchají s 0,05 ml *síranu měďnatého RS* a přidá se 0,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vznikne fialové zbarvení.

B. 0,5 g zkoušené látky se ve zkumavce smíchá s 10 ml *vody R*. Nechá se stát 10 min, pak se zahřívá 15 min při 60 °C a zkumavka se nechá stát 6 h při 0 °C v kolmé poloze. Při otočení zkumavky obsah okamžitě nevyteče.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* při teplotě asi 55 °C a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml. Roztok se uchovává při této teplotě k dalším zkouškám.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_4$ (*2.2.2, Metoda II*). Roztok S připravený ze želatiny typu A nebo typu B neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze IV (*2.2.1*). Směsi želatiny typu A a typu B mohou tvořit opalizující roztoky, jejichž opalescence je vyvolána tvorbou koacervátů, v širokém rozmezí hodnot pH v závislosti na koncentraci.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,8 až 7,6; měří se roztok S.

Fenolické konzervační látky. *Provádí se za ochrany před světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1 g se smíchá s 20 ml *methanolu R* a 2 ml *amoniaku 17,5% RS* a nechá se 20 h stát. Pak se čirý roztok slije, odpaří se do sucha a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok. 2 mg *ethylparabenu R* nebo *methylparabenu R* nebo *propylparabenu R* a 2 mg *naftylaminu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

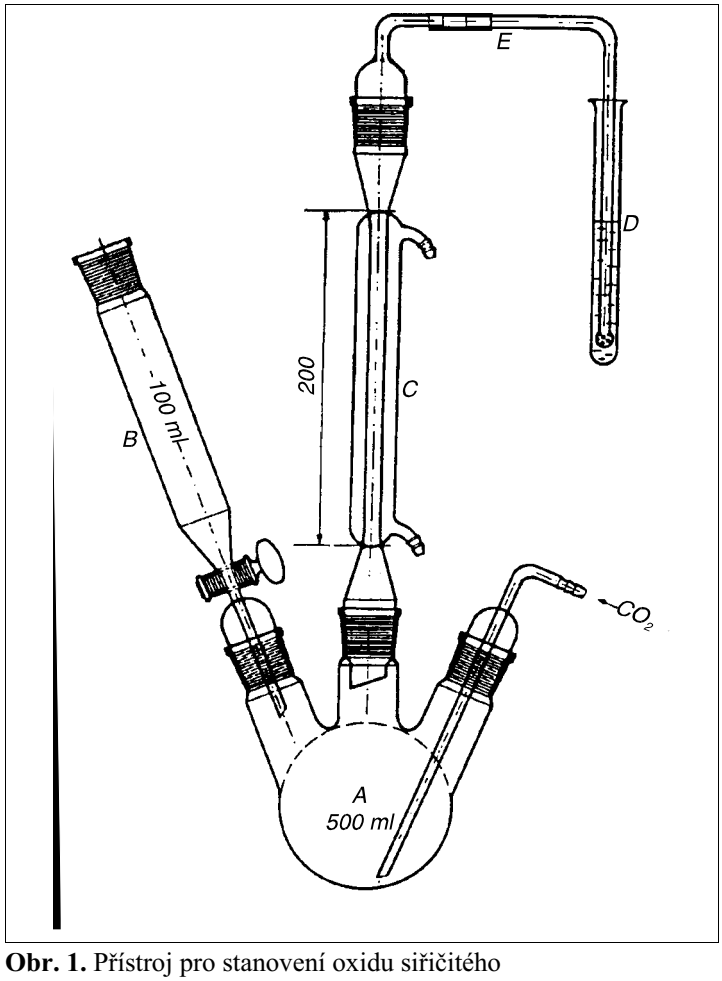
Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Na každý nanesený pruh se po vysušení nanese ještě 10 μl roztoku *dimethylaminonaftalensulfonylchloridu R* (1 g/l) v *acetonu R*. Odděleně se nanese do pruhu (20 mm x 3 mm) 10 μl roztoku *dimethylaminonaftalensulfonylchloridu R* (1 g/l) v *acetonu R*. Nanesené pruhy se postříkají roztokem *tetraboritanu sodného R* (50 g/l). Vrstva se suší 15 min při 60 °C. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethanolu R* a *toluenu R* (8 + 92) po dráze 12 cm. Vysuší se na vzduchu a pozoruje se ihned v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je patrna intenzivní žlutě fluoreskující skvrna s hodnotou R_F 0,4 až 0,6 (derivát dimethylaminonaftalensulfonylchloridu). Na chromatogramu roztoku dimethylaminonaftalensulfonylchloridu jsou patrné modře fluoreskující skvrny na startu a v blízkosti čela chromatogramu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není ve střední části patrna žlutě až oranžově nebo modře fluoreskující skvrna nebo skvrny modře fluoreskující s vyšší hodnotou R_F (deriváty aminokyselin). Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrny skvrny zhášející fluorescenci s hodnotou R_F 0,3 až 0,5 (estery kyseliny 4-hydroxybenzoové). Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou patrné skvrny s hodnotou R_F 0,3 až 0,5 (pentachlorofenol nebo estery kyseliny 4-hydroxybenzoové).

Oxid siřičitý. Nejvýše 200 μg/g. 150 ml *vody R* se převede do baňky (A) (viz obrázek) a celý systém se promývá 15 min *oxidem uhličitým R* při průtoku 100 ml/min. Do zkumavky (D) se převede 10 ml *peroxidu vodíku zředěného RS* zneutralizovaného na roztok *modři bromfenolové R* (1 g/l) v *lihu R* 20% (*V/V*). Bez přerušení průtoku oxidu uhličitého se odstraní nálevka (B) a do baňky se otvorem převede pomocí 100 ml *vody R* 25,0 g zkoušené látky. Nálevkou se přidá 80 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vaří se 1 h. Pak se otevře uzávěr nálevky, uzavře se přívod oxidu uhličitého, ukončí se zahřívání a chlazení vodou. Obsah zkumavky se převede pomocí malého množství *vody R* do kuželové baňky na 200 ml se širokým hrdlem, zahřívá se 15 min na vodní lázni a pak se ochladí. Přidá se 0,1 ml roztoku *modři bromfenolové R* (1 g/l) v *lihu R* 20% (*V/V*) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na fialovomodré.

Obsah oxidu siřičitého v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$128a,$$

v němž značí:
a - spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* v mililitrech.



Obr. 1. Přístroj pro stanovení oxidu siřičitého
Rozměry v milimetrech

Peroxidy. 1,0 g se rozpustí zahřátím v 10 ml *vody R* a smíchá se s *oxidem vanadičným v kyselině sírové RS*. Roztok není zbarven intenzivněji oranžově žlutě než porovnávací roztok složený ze směsi 1 ml roztoku *peroxidu vodíku R* (0,1 g/l) a 9 ml *vody R* (100 μg H_2O_2/g).

Mohutnost gelu. Pokud je látka určena pro přípravu globulí, čípků a zinkové želatiny, mohutnost gelu je 150 g až 250 g.

Mohutnost gelu se vyjadřuje jako množství v gramech potřebné ke vzniku síly, která vtlačí píst o průměru 12,7 mm do gelu o koncentraci 6,67 % při 10 °C do hloubky 4 mm.

Přístroj. Popis gelometru:

- válcovitý píst o průměru (12,7 ± 0,1) mm s rovnou dolní stranou a s okrouhlým okrajem o poloměru 0,5 mm,
- zařízení pro nastavení výšky baňky obsahující gel tak, aby se povrch pístu dotýkal hladiny gelu bez použití vnějšího tlaku,
- zařízení na vnější zatížení pístu s konstantní rychlostí 40 g/s,
- zařízení na svislý pohyb pístu, který může být přerušen v jedné čtyřicetině sekundy, při poklesu o (4 ± 0,1) mm,

- měřicí zařízení (váhy) pro měření finálního zatížení s přesností na ±0,5 g,
- baňka o vnitřním průměru (59 ± 1) mm a výšce 85 mm.

Postup. 7,5 g zkoušené látky se v baňce smíchá se 105 ml *vody R*, hrdlo baňky se překryje hodinovým sklíčkem a nechá se 3 h stát. Pak se zahřívá 15 min ve vodní lázni při 65 °C. Během zahřívání se míchá obsah skleněnou tyčinkou tak, aby roztok byl homogenní a na vnitřních stěnách baňky se netvořily kapky vody. Ochladí se na pokojovou teplotu a po 15 min se baňka vloží do vodní lázně opatřené termostatem nastavitelným na (10 ± 0,1) °C. Baňka se uzavře gumovou zátkou a nechá se stát 16 h až 18 h ve svislé poloze. Pak se ihned vloží do gelometru tak, že hladina gelu se dotýká pístu bez použití vnějšího tlaku. Zátěž pístu se zvýší rychlostí 40 g/s tak, aby píst poklesl o (4 ± 0,1) mm. Vnější síla vyvinutá na píst v tomto okamžiku měřená v gramech vyjadřuje mohutnost gelu. Stanovení se provede nejméně třikrát, ze stanovení se vypočítá průměrná hodnota.

Arsen (*2.4.2*). Vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (1 μg/g). 1,0 g se smíchá se směsí 10 ml *vody R*, 2,5 ml *kyseliny sírové R*, 2,5 ml *kyseliny dusičné R* a malým nadbytkem *bromové vody R*. Po 30 min stání se vaří 1 h pod zpětným chladičem.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 10 ml *základního roztoku olova R* (10 μg Pb/ml).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 2,0 %.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce (*2.6.13*) na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- je-li látka vhodná pro přípravu globulí, čípků nebo zinkové želatiny, a je-li tomu tak, ještě mohutnost gelu.

† Gentamicini sulfas

Gentamiciniumsulfat

Synonymum. Gentamycinium sulfuricum, síran gentamycinia

CAS 1405-41-0

Je to směs síranů látek s antibiotickou účinností produkovaných mikroorganismem *Micromonospora purpurea*. Počítáno na bezvodou látku, účinnost je nejméně 590 m.j. v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v etheru a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *vody R* a přidá se 5 ml roztoku *kyseliny sírové R* (400 g/l). 100 min se zahřívá na vodní lázni, ochladí se a zředí *vodou R* na 25 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 240 nm až 330 nm *(2.2.25);* roztok nevykazuje žádné absorpční maximum.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *gentamiciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se spodní vrstvou směsi stejných objemových dílů *chloroformu R*, *methanolu R* a *amoniaku 26% R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká *ninhydrinem RS1* a 5 min se zahřívá při 110 °C. Tři hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku se shodují polohou, barvou a velikostí se třemi hlavními skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Složení. Chromatogram zkoušeného roztoku vykazuje čtyři hlavní píky se stejnými retenčními časy jako čtyři hlavní píky na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,8 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než 6. stupeň porovnávacího barevného roztoku nejpodobnější barvy *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 5,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +107° až +121°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Methanol. Nejvýše 1,0 %; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 2,5 ml 1-*propanolu R* se zředí *vodou R* na 500,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí ve 2,0 ml *vody R.*
Zkoušený roztok (b). 0,50 g se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a přidá se 1,0 ml *vody R.*
Porovnávací roztok. 1,25 ml *methanolu R* se smíchá s 1,25 ml *propanolu R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m až 2,0 m a vnitřního průměru 2 mm až 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzenem kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s konstantní průtokovou rychlostí od 30 ml do 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na konstantní hodnotě v rozmezí 120 °C až 140 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je nejméně o 50 °C vyšší než teplota kolony. Nastříknou se zvolené objemy zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku. Obsah methanolu se vypočítá za použití hustoty, která je při teplotě 20 °C 0,792 g/cm^3.

Složení. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *methanolu R* a 4 ml *zkoumadla ftaldialdehydového R*, promíchá se a zředí *methanolem R* na 25,0 ml. Zahřívá se 15 min ve vodní lázni při 60 °C a ochladí se na pokojovou teplotu. Jestliže se roztok nepoužije ihned, ochladí se na 0 °C a použije se do 4 h.

Porovnávací roztok. Připraví se stejně jako zkoušený roztok, místo zkoušené látky se použije *gentamiciniumsulfat CRL*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m až 0,125 m a vnitřního průměru 4,6 mm až 5 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je roztokem 5,5 g *heptansulfonanu sodného R* ve směsi 50 ml *kyseliny octové ledové R*, 250 ml *vody R* a 700 ml *methanolu R1*. Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru s asi 10μl průtokovou kyvetou a možnostmi měření při 330 nm (pro detektor s nastavitelnou vlnovou délkou) nebo 340 nm (pro detektor s filtrem).

Zaznamenají se chromatogramy za podmínek shora uvedených. Retenční čas složky C_2 je 10 min až 20 min, velmi dobře jsou odděleny píky s relativními retenčními časy asi 0,13 (zkoumadlo), 0,27 (složka C_1), 0,65 (složka C_{1a}), 0,85 (složka C_{2a}) a 1,00 (složka C_2). Nastříkne se 5 μl porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, pokud rozlišení mezi píky složek C_{2a} a C_2 není menší než 1,3. V případě potřeby se upraví obsah methanolu v mobilní fázi tak, aby se toho dosáhlo.

Nastříkne se 5 μl porovnávacího roztoku. Nastaví se citlivost zesilovače tak, aby výška píku složky C_1 byla asi 75 % stupnice zapisovače. Na chromatogramu se vyznačí základní vodorovná linie od rovné části křivky těsně před píkem zkoumadla a od ní se změří výšky píků všech složek.

Pro každou složku se vypočítá odezvový faktor R_x ze vzorce:

$$R_x = \frac{H_x}{F_x},$$

v němž značí:

F_x - deklarovaný podíl složky C_x v *gentamiciniumsulfatu CRL*,

H_x - výšku píku složky C_x na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Nastříkne se 5 μl zkoušeného roztoku. Nastaví se citlivost zesilovače tak, aby výška píku složky C_1 byla asi 75 % stupnice zapisovače. Na chromatogramu se vyznačí základní vodorovná linie od rovné části křivky těsně před píkem zkoumadla a od ní se změří výšky píků všech složek. Relativní podíly složek C_1, C_{1a}, C_2 a C_{2a} ve zkoušené látce vyjádřené v procentech se vypočítají ze vzorce:

$$C_x = \frac{\dfrac{H'_x}{R_x} \cdot 100}{\dfrac{H'_1}{R_1} + \dfrac{H'_{1a}}{R_{1a}} + \dfrac{H'_{2a}}{R_{2a}} + \dfrac{H'_2}{R_2}},$$

v němž značí:

H'_x - výšku píku pro složku C_x na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Relativní podíly složek jsou v těchto rozmezích: C_1 25,0 % až 50,0 %, C_{1a} 10,0 % až 35,0 %, C_2 a C_{2a} 25,0 % až 55,0 %.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 15,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Sírany. 32,0 % až 35,0 %, počítáno na bezvodou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody destilované R* a *amoniakem 26% R* se upraví pH roztoku na 11. Přidá se 10,0 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *ftaleinpurpuru R* a titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se začíná barva roztoku měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud nezmizí fialově modrá barva.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních nebo očních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1,67 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik *(2.7.2)*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

Gentianae radix

Hořcový kořen

Synonymum. Radix gentianae

Jsou to usušené úlomky kořenů a oddenků druhu *Gentiana lutea* L.

Vlastnosti

Droga má charakteristický pach a přetrvávající, intenzivně hořkou chuť.

Droga je tvořena jednoduchými nebo rozvětvenými válcovitými kusy kořenů a oddenků různé délky, zpravidla o průměru 10 mm až 40 mm, v oblasti kořenové hlavy až 80 mm.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Droga na povrchu hnědošedá, na lomu nažloutlá až červenožlutá, ne však červenohnědá. Kořen je podélně vrásčitý, obyčejně s jizvami po postranních kořenech. Rozvětvený oddenek s kruhovitými, hustě uspořádanými listovými jizvami, často i s terminálním pupenem. Oddenek a kořen se sušením stávají drobivé s krátkým lomem. Snadno vlhnou a dají se pak ohýbat.

Na povrchu hladkého příčného řezu je patrna kůra zasahující přibližně až do jedné třetiny průměru kořene. Od nevýrazně paprsčitého, převážně parenchymatózního dřeva je oddělena zřetelně patrným kambiem.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle hnědý nebo žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky korku tvořeného tenkostěnnými žlutohnědými buňkami a ztlustlými kolenchymatickými buňkami (feloderm); úlomky parenchymatických buněk kůry a dřeva s mírně ztlustlými stěnami, obsahující kapky oleje a malé hranolovité a jehlicovité krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky zdřevnatělých cév šroubovitě nebo síťovitě ztlustlých.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 2,0 g práškované drogy (355) se míchá 20 min s 50 ml *methanolu R* a pak se rychle zfiltruje tak, aby docházelo k co nejnižším ztrátám rozpouštědla. 25 ml filtrátu se odpaří za sníženého tlaku do sucha při teplotě nepřesahující 50 °C. Odparek se rozpustí v malém množství *methanolu R*, tak aby se získalo 5 ml roztoku; v roztoku může zůstat usazenina.
Porovnávací roztok. 50 mg *fenazonu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (30 mm x 8 mm) 50 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *chloroformu R* a *acetonu R* (2 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny zhášející fluorescenci v dolní a obvykle i v horní části chromatogramu; skvrna ve střední části chromatogramu (amarogentin) odpovídá svojí polohou skvrně fenazonu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrna odpovídající fenazonu se označí. Vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem *červeně pravé B R* (2 g/l). Pozoruje se po 10 min v denním světle. Skvrna odpovídající amarogentinu je oranžová, po vystavení vrstvy působení amoniaku se barví červeně. Kromě toho jsou vidět na chromatogramu zkoušeného roztoku v dolní a horní části i další zbarvené skvrny. Zejména v horní části chromatogramu je obvykle velmi intenzivní skvrna s vysokým R_F odpovídající zbarvením skvrně amarogentinu.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky totožnosti C. Po alkalizaci parami amoniaku nejsou na chromatogramu zkoušeného roztoku patrny těsně nad skvrnou amarogentinu žádné fialově zbarvené skvrny (jiné druhy rodu *Gentiana*).

Číslo hořkosti. Nejméně 10 000. Provádí se srovnáním s chininiumchloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000. Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění, které chutná ještě hořce.

Základní roztok chininiumchloridu. 0,100 g *chininiumchloridu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (710) se přelije 1000 ml vařící *vody R* a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, prvních 20 ml filtrátu se odstraní.

Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 4,2 ml základního roztoku chininiumchloridu a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Určí se roztok nejnižší koncentrace, který chutná ještě hořce. 10,0 ml roztoku nejnižší koncentrace se převaluje 30 s v ústech tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka. Jestliže roztok nechutná hořce, vyplivne se a po 1 min se ústa vypláchnou vodou. Po 10 min se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor *k* se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{5{,}00}{n},$$

v němž značí:

n - počet ml základního roztoku chininiumchloridu, který chutnal ještě hořce.

10/*k* ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku chutná hořce.

Vodný extrakt. 5,0 g práškované drogy (710) se smíchá s 200 ml vroucí *vody R* a nechá se stát 10 min za občasného protřepávání. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 200 ml a zfiltruje se. 20,0 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha. Odparek se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejméně 0,165 g (33 %).

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

Geranii etheroleum

N

Geraniová silice

Synonyma. Geranii aetheroleum, Oleum geranii

Je to silice získaná z listů různých druhů rodu *Pelargonium* destilací s vodní parou. Obsahuje 65,0 % až 75,0 % alkoholů, počítáno jako geraniol ($C_{10}H_{18}O$; M_r 154,25).

Vlastnosti

Bezbarvá až nažloutlá nebo nazelenalá čirá kapalina, charakteristického pachu. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, etherem a mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *geraniolu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,884 až 0,905 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,462 až 1,474.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -5° až -14°.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 5,0; 5,0 g zkoušené látky se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Zbytek po odpaření silice je nejvýše 0,150 g.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná ve třech objemových dílech *lihu R* 70% *(V/V)*.

Stanovení obsahu

5,0 ml se smíchá v acetylační baňce se 7,5 ml *acetanhydridu R* a 1,0 g *octanu sodného bezvodého R* a vaří se 2 h. Pak se přidá 20,0 ml *vody R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni pod zpětným chladičem za častého protřepávání. Po ochlazení se acetylovaná silice převede do dělicí nálevky, vodná vrstva se odstraní. Acetylovaná silice se protřepává *vodou R*, až vodná vrstva reaguje na povlhčený *papír lakmusový modrý R* jen slabě kysele, vodná vrstva se vždy odstraní. Acetylovaná silice se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se.

1,500 g acetylované silice se smíchá se 3 ml *lihu 96% R* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a po kapkách se přidává *hydroxid draselný v lihu 0,5 mol/l VS* do trvalého zbarvení. Pak se přidá 20,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah acetylovatelných složek v procentech, vyjádřeno jako geraniol ($C_{10}H_{18}O$), se vypočítá podle vzorce:

$$x = \frac{a \,.\, 7{,}712}{m - a \,.\, 0{,}021} ,$$

v němž značí:

a - rozdíl spotřeb *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* ve zkoušce a slepé zkoušce v mililitrech,

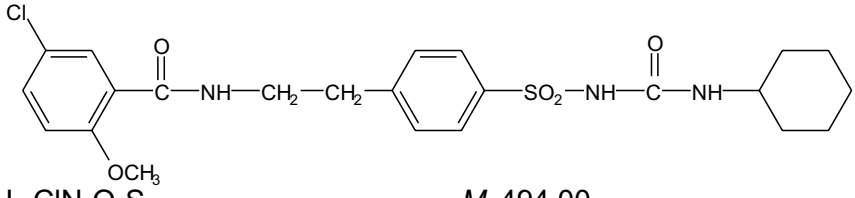
m - navážku acetylované silice v gramech.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

† Glibenclamidum

Glibenklamid



$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ M_r 494,00 CAS 10238-21-8

Je to 1-{4-[2-(5-chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]fenylsulfonyl}-3-cyklohexylmočovina. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 169 °C až 174 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R*, je-li potřeba, použije se ultrazvuková lázeň a zředí se *methanolem R* na 50,0 ml. K 10,0 ml se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance při 230 nm až 350 nm *(2.2.25);* roztok vykazuje maximum při 300 nm a méně intenzivní maximum při 275 nm. Specifická absorbance v maximu při 300 nm je 61 až 65 a v maximu při 275 nm je 27 až 32.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky s *bromidem draselným R* se shoduje se spektrem *glibenklamidu CRL*. Vykazují-li spektra rozdíly, navlhčí se zkoušená látka a referenční látka *methanolem R*, rozetře se, vysuší se při 100 °C až 105 °C a spektra se zaznamenají znovu.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je polohou a velikostí shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. 20 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové R*. Roztok je bezbarvý a vykazuje modrou fluorescenci v ultrafialovém světle při 365 nm. V roztoku se rozpustí 0,1 g *chloralhydrátu R;* během 5 min se zbarvení změní na sytě žluté a asi za 20 min vznikne hnědavý odstín.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*. Roztoky se připraví rozpouštěním látek v rozpouštědlové směsi, kterou jsou stejné objemové díly *methanolu R* a *dichlormethanu R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v rozpouštědlové směsi a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí rozpouštědlovou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *glibenklamidu CRL* se rozpustí v rozpouštědlové směsi a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 8 mg *4-[2-(5-chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]benzensulfonamidu CRL (glibenklamidu nečistoty A CRL)* se rozpustí v rozpouštědlové směsi a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí rozpouštědlovou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,2 g *glibenklamidu CRL* se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a vaří se 10 min pod zpětným chladičem.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R*, *kyseliny octové, ledové R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (5 + 5 + 45 + 45) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není skvrna odpovídající *glibenklamidu nečistotě A CRL* intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající *glibenklamidu nečistotě A*, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže porovnávací roztok (d) vykazuje dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí zahřátím ve 100 ml *lihu 96% R*, přidá se 1,0 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku červeného zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 49,40 mg $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$.

Uchovávání

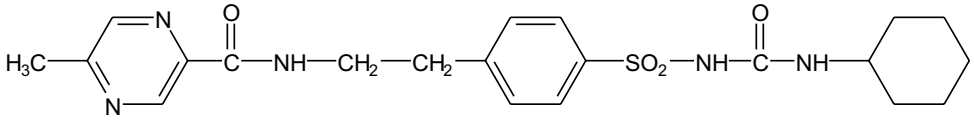
Separandum.

Nečistoty

A. 4-[2-(5-chlor-methoxybenzamido)ethyl]benzensulfonamid.

† Glipizidum

Glipizid



$C_{21}H_{27}N_5O_4S$ M_r 445,54 CAS 29094-61-9

Je to 1-cyklohexyl-3-{4-[2-(5-methylpyrazin-2-karboxamido)ethyl]-benzensulfonyl}močovina. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{27}N_5O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Asi 2 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 226 nm a 274 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 226 nm k absorbanci naměřené při 274 nm je 2,0 až 2,4.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *glipizidu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 50 mg se rozpustí v 5 ml *dioxanu R*. Přidá se 1 ml roztoku *fluordinitrobenzenu R* (5 g/l) v *dioxanu R* a vaří se 2 min až 3 min; vznikne žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *glipizidu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 5 mg *glipizidu nečistoty A CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 4 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (e). 5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí porovnávacím roztokem (b) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, ethylacetatu R* a *dichlormethanu R* (25 + 25 + 50) po dráze 15 cm.

Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající glipizidu nečistoty A není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající glipizidu nečistoty A, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Cyklohexylamin. Nejvýše 100 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *dekanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 25 mg *dekanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *hexanem R* na 50 ml.
Zkoušený roztok (a). 3,0 g se rozpustí v 50 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (12 g/l) a vytřepe se dvakrát 5,0 ml *hexanu R*. Použijí se spojené vrchní vrstvy.
Zkoušený roztok (b). 3,0 g se rozpustí v 50 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (12 g/l) a vytřepe se dvakrát 5,0 ml roztoku vnitřního standardu. Použijí se spojené vrchní vrstvy.
Porovnávací roztok. 30,0 mg *cyklohexylaminu R* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (17,5 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 50 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (12 g/l) a vytřepe se dvakrát 5,0 ml roztoku vnitřního standardu. Použijí se spojené vrchní vrstvy.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 10 % *makrogolu 20 000 R* a 4 % *hydroxidu draselného R*,
- *dusíku pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C a teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 120 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška prvního píku (dekanu) a druhého píku (cyklohexylaminu) byly nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi těmito dvěma píky není menší než 2. Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku (a). Na získaném chromatogramu se ověří, že zde není přítomen žádný pík se stejným retenčním časem odpovídajícím retenčnímu času vnitřního standardu. Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku (b) a 1 μl porovnávacího roztoku. Z chromatogramu porovnávacího roztoku se vypočítá poměr (*R*) plochy píku odpovídajícího cyklohexylaminu k ploše píku odpovídajícího vnitřnímu standardu. Z chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se vypočítá poměr plochy píku odpovídajícího cyklohexylaminu k ploše píku odpovídajícího vnitřnímu standardu. Tento poměr není větší než *R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 C až 105 C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *methoxidem lithným 0,1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *červeně chinaldinové RS* jako indikátoru do odbarvení červeného zbarvení.

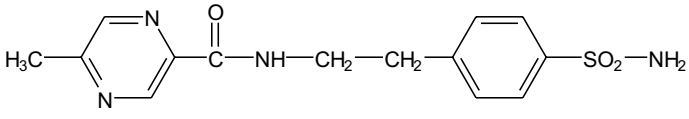
1 ml *methoxidu lithného 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,55 mg $C_{21}H_{27}N_5O_4S$.

Uchovávání

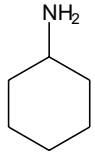
V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

Nečistoty



A. 4-[2-(5-methyl-2-pyrazinkarboxamido)ethyl]benzensulfonamid,



B. cyklohexylamin.

† Glucagonum

Glukagon

His–Ser–Gln–Gly–Thr–Phe–Thr–Ser–Asp–Tyr–Ser–Lys–Tyr–Leu–Asp–

Ser–Arg–Arg–Ala–Gln–Asp–Phe–Val–Gln–Trp–Leu–Met–Asn–Thr

$C_{153}H_{225}N_{43}O_{49}S$ M_r 3482,78 CAS 16941-32-5

Je to polypeptidický hormon získaný z hovězí nebo prasečí slinivky. Podporuje štěpení glykogenu v játrech a tím zvyšuje koncentraci glukosy v krvi. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje v miligramu nejméně 1 m.j.

Glukagon se připravuje za podmínek, které zajišťují minimální mikrobiální kontaminaci.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a ve většině organických rozpouštědel. Je rozpustný ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. Způsobuje zvýšení koncentrace glukosy v krvi ve zkoušce na zvířatech, je-li podán způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

B. Hodnotí se elektroforeogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní zóna na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) se shoduje polohou s hlavní zónou na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Absorbance. 2,5 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml. Specifická absorbance *(2.2.25)* měřená v maximu při 276 nm je 21 až 25, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Stanoví se gelovou elektroforézou na polyakrylamidu *(2.2.31)* za použití tyčinkového gelu délky 75 mm, průměru 5 mm a *tlumivého roztoku trometamol-glycinového o pH 8,3*. Elektroda v horní nádobě je katoda a v dolní nádobě anoda.

Použije se následující gelová směs: 1 objemový díl roztoku obsahujícího ve 100 ml 36,6 mg *trometamolu R*, 0,23 ml *tetramethylethylendiaminu R* a 48,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 2 objemové díly roztoku obsahujícího ve 100 ml 0,735 g *methylenbisakrylamidu R* a 30,0 g *akrylamidu R*. Přidá se takové množství *močoviny R*, aby její koncentrace v konečném roztoku byla 480 g/l, a pak se roztok zředí na 7 objemových dílů *vodou R*. Jestliže je to nutné, zahřeje se nejvýše na 40 °C, aby se rozpustila *močovina R*. Po odplynění se přidá 1 objemový díl roztoku *peroxodisíranu diamonného R* (5,6 g/l).

Zkoušený roztok (a). 10 mg se rozpustí v 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l RS*.
Zkoušený roztok (b). 0,25 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). Množství *glukagonu BRP* odpovídající 5 m.j. se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,01 mol/l RS* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok (b). 8 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 6 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 4 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok (e). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 10 ml.

Na povrch gelu se nanese odděleně po 100 μl každého roztoku, přidá se tlumivý roztok a 0,2 ml *modři bromfenolové RS*. Elektroforéza probíhá při konstantním proudu 1 mA na trubici po dobu 30 min a pak se proud zvýší na 3 mA na trubici. Po skončení se gely ponoří do roztoku *kyseliny trichloroctové R* (125 g/l) nejméně na 1 h. Na každých 10 ml roztoku kyseliny trichloroctové se přidá 0,5 ml roztoku *modři kyselé 90 R* (2,5 g/l) a nechá se stát 12 h. Po odstranění

barvicího roztoku se gely promyjí dvakrát směsí objemových dílů *kyseliny octové R* a *vody R* (1 + 4), která se vždy odstraní. Gely se uchovávají ve stejné směsi *kyseliny octové R* a *vody R*. Elektroforeogramy se pozorují za použití zdroje studeného světla. Na elektroforeogramech zkoušeného roztoku (a) žádná zóna, kromě zóny modři bromfenolové migrující v dvoj- až trojnásobku vzdálenosti hlavní zóny, není intenzivnější než hlavní zóna na elektroforeogramu porovnávacího roztok (e). Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (b) není žádná zóna migrující těsně před hlavní zónou intenzivnější než hlavní zóna na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže je patrna zóna na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (e) a je zřejmé odstupňování intenzity zbarvení na elektroforeogramech porovnávacích roztoků (a) až (e).

Dusík. 16,0 % až 18,5 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se mineralizací s kyselinou sírovou *(2.5.9)*.

Zinek. Nejvýše 0,15 % Zn; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml. Je-li třeba, zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* tak, aby koncentrace zinku byla 0,4 μg/ml až 1,6 μg/ml.
Porovnávací roztoky. Použijí se čerstvě připravené roztoky obsahující 0,10 μg, 0,40 μg, 0,80 μg, 1,00 μg, 1,20 μg a 1,60 μg Zn v mililitru. K přípravě porovnávacích roztoků se použije základní *roztok zinku (5 mg Zn/ml)*, který se ředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového plamene vhodného složení (např. 2 l acetylenu a 11 l vzduchu za min).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 50,0 mg se suší 24 h v sušárně při 105 °C.

Sterilita *(2.6.1)*. Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví hodnocením vyvolaného hyperglykemického účinku za daných podmínek v porovnání s účinkem mezinárodního standardu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je specifická hyperglykemická účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je lyofilizovaný glukagon s přídavkem laktosy a chloridu sodného. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Stanovená účinnost je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je v rozmezí 64 % až 156 % deklarované účinnosti.

Porovnávací roztok. Celý obsah ampule standardu se rozpustí ve 2 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), pH se upraví na hodnotu 3,0 *kyselinou chlorovodíkovou R* a zředí se stejným rozpouštědlem tak, aby roztok obsahoval např. 0,1 m.j v mililitru. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a použije se do 2 dnů.

Ke zkoušce se použijí zdraví králíci, jejichž rozdíl hmotnosti mezi nejlehčím a nejtěžším není větší než 1,2 kg (např. se použijí králíci o hmotnosti v rozmezí 1,8 kg až 2,8 kg). Zvířata se chovají v laboratoři v jednotných podmínkách a při jednotné dietě nejméně 1 týden před zkouškou. Vyžadují opatrné zacházení, aby se předešlo nežádoucímu vzrušení.

Každému králíkovi se 48 h před zkouškou nitrosvalově vstříkne 1 ml roztoku kortisonacetatu (25 g/l). Strava, kromě vody, se zvířatům nepodává 16 h před začátkem zkoušky, v čase zkoušky

až do posledního odběru krve. Králíci se rozdělí náhodně do čtyř stejných skupin po nejméně čtyřech králících.

Připraví se dvě ředění porovnávacího roztoku s koncentrací v poměru 1 : 4, např. 0,006 m.j./ml (ředění porovnávacího roztoku 1) a 0,024 m.j./ml (ředění porovnávacího roztoku 2). Jako rozpouštědlo se použije roztok *chloridu sodného R (9 g/l)*, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 3,0 *kyselinou chlorovodíkovou R*. Pro rozpuštění zkoušené látky se použije stejného rozpouštědla a připraví se dvě ředění. U ředění zkoušeného roztoku 1 se na základě deklarované účinnosti předpokládá, že obsahuje stejný počet m.j. v mililitru jako ředění porovnávacího roztoku 1. U ředění zkoušeného roztoku 2 se předpokládá, že obsahuje stejný počet m.j./ml jako ředění porovnávacího roztoku 2. 1,0 ml každého ředění se vstříkne podkožně v pořadí uvedeném v následující tabulce. Druhá injekce se podává přibližně 24 h po první injekci.

	Skupina králíků			
	1	2	3	4
1. injekce	porovnávací roztok - ředění 1	porovnávací roztok - ředění 2	zkoušený roztok - ředění 1	zkoušený roztok - ředění 2
2. injekce	zkoušený roztok - ředění 2	zkoušený roztok - ředění 1	porovnávací roztok - ředění 2	porovnávací roztok - ředění 1

Vzorky krve se odebírají z marginální ušní žíly každého králíka. 1 h po každé injekci se odebere vhodný vzorek krve a v každém vzorku se stanoví koncentrace glukosy. Optimální doba odběru závisí na chovu. Důležité při zkoušce je, aby byl pro každého králíka zachován stejný časový interval.

Účinnost se vypočítá běžnou statistickou metodou pro párový křížový pokus.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě pod 8 °C, přednostně při -20 °C.

Separandum.

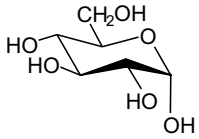
Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v obalu,
- počet mezinárodních jednotek na miligram,
- podmínky uchovávání,
- zda je látka sterilní.

Glucosum

Glukosa

Synonyma. Glucosum anhydricum, Dextrosum anhydricum, Saccharum amylaceum



$C_6H_{12}O_6$ M_r 180,16 CAS 50-99-7

Je to α-D-glukopyranosa.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, sladké chuti. Je snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *glukosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL,* 10 mg *fruktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené skvrny se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla mají být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi složené z 5 ml *kyseliny sírové R* a 95 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidají se 3 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. 10,0 g se rozpustí v 15 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)*, bez pachu a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 6,0 g se rozpustí ve 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +52,5° až +53,3°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený takto: 10,0 g se rozpustí v 80 ml *vody R* a smíchá se s 0,2 ml *amoniaku zředěného RS1*. 30 min se nechá stát a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Cizí cukry, rozpustný škrob, dextriny. 1,0 g se za varu rozpustí ve 30 ml *lihu R* 90% (*V/V*); vzhled roztoku se po ochlazení nemění.

Siřičitany.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí ve 40 ml *vody R*, přidají se 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (310 g/l), 2,0 ml *fuchsinu RS1* a 2,0 ml roztoku *formaldehydu R 0,5% (V/V)* a 30 min se nechá stát.

Porovnávací roztok. 76 mg *disiřičitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 3,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se ihned přidá 1 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (310 g/l), 2,0 ml *fuchsinu RS1* a 2,0 ml roztoku *formaldehydu R* 0,5% (*V/V*) a 30 min se nechá stát.

Měří se absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při 583 nm proti kontrolnímu roztoku připravenému současně stejným způsobem za použití 10,0 ml *vody R*. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (*15 μg SO_2/g*).

Chloridy *(2.4.4)*. 4 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovují limitní zkoušce na chloridy (125 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (1 μg/g).

Baryum. 10 ml roztoku S se smíchá s 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Pozoruje se ihned a pak po 1 h. Roztok vyhovuje zkoušce, jestliže není případně vzniklá opalescence intenzivnější než opalescence směsi 1 ml *vody destilované R* a 10 ml roztoku S.

Vápník *(2.4.3)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Olovo v cukrech *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce na olovo v cukrech (0,5 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Síranový popel. Nejvýše 0,1 %. 5,0 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti. Je-li třeba, zahřívání s *kyselinou sírovou R* se opakuje.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Pokud je látka určena k přípravě velkoobjemových parenterálních přípravků, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstřikuje nitrožilně 10 ml roztoku zkoušené látky (50 g/l) ve *vodě na injekci R*.

Uchovávání

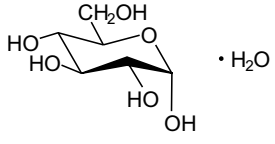
V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka prostá pyrogenních látek.

Glucosum monohydricum

Monohydrát glukosy



$C_6H_{12}O_6 . H_2O$ M_r 198,17 CAS 5996-10-1

Je to monohydrát α-D-glukopyranosy.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, sladké chuti. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *glukosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL,* 10 mg *fruktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené skvrny se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla mají být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi složené z 5 ml *kyseliny sírové R*

a 95 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 3 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. 10,0 g se rozpustí v 15 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)*, bez pachu a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 6,0 g se rozpustí ve 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +52,5° až +53,3°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený takto: 10,0 g se rozpustí v 80 ml *vody R* a smíchá se s 0,2 ml *amoniaku zředěného RS1*. 30 min se nechá stát a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Cizí cukry, rozpustný škrob, dextriny. 1,0 g se za varu rozpustí ve 30 ml *lihu 90% (V/V) RS;* vzhled roztoku se po ochlazení nemění.

Siřičitany.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí ve 40 ml *vody R*, přidají se 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (310 g/l), 2,0 ml *fuchsinu RS1* a 2,0 ml roztoku *formaldehydu R 0,5% (V/V)* a 30 min se nechá stát.

Porovnávací roztok. 76 mg *disiřičitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 3,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se ihned přidá 1 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (310 g/l), 2,0 ml *fuchsinu RS1* a 2,0 ml roztoku *formaldehydu R* 0,5% (*V/V*) a 30 min se nechá stát.

Měří se absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při 583 nm proti kontrolnímu roztoku připravenému současně stejným způsobem za použití 10,0 ml *vody R*. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (*15 μg SO₂/g*).

Chloridy *(2.4.4)*. 4 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovují limitní zkoušce na chloridy (125 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (1 μg/g).

Baryum. 10 ml roztoku S se smíchá s 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS.* Pozoruje se ihned a pak po 1 h. Roztok vyhovuje zkoušce, jestliže není případně vzniklá opalescence intenzivnější než opalescence směsi 1 ml *vody destilované R* a 10 ml roztoku S.

Vápník *(2.4.3)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Olovo v cukrech *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce na olovo v cukrech (0,5 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 7,0 % až 9,5 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Síranový popel. Nejvýše 0,1 %. 5,0 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti. Je-li třeba, zahřívání s *kyselinou sírovou R* se opakuje.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Pokud je látka určena k přípravě velkoobjemových parenterálních přípravků, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstřikuje nitrožilně 10,0 ml roztoku zkoušené látky (55 g/l) ve *vodě na injekci R*.

Uchovávání

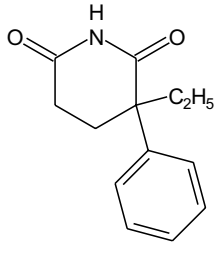
V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka prostá pyrogenních látek.

§ Glutethimidum

Glutethimid



$C_{13}H_{15}NO_2$ M_r 217,27 CAS 77-21-4

Je to (*RS*)-3-ethyl-3-fenyl-2,6-piperidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{15}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 86 °C až 89 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem *glutethimidu CRL*.

C. 2 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R*, přidá se 5 ml ochlazené směsi 1 ml *formaldehydu R* a 9 ml *kyseliny sírové R* a 15 min se zahřívá na vodní lázni; roztok je světle červený a v ultrafialovém světle při 365 nm vykazuje intenzivní modrou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,20 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. Vzniklé modré zbarvení nemusí být stálé, k další změně zbarvení se nepřihlíží.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *ethanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a vloží se na 1 min do komory obsahující chlor připravený přidáním *kyseliny chlorovodíkové R* k roztoku *manganistanu draselného R* (50 g/l). Po vyjmutí z komory se vrstva nechá 2 min stát a potom se postříká *škrobem s jodidem draselným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 μg/g). Použije se porovnávací roztok olova (1 μg Pb/ml) připravený zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (10 + 90).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g ve vakuu po dobu 4 h.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu R*, přidá se 5 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití indikační stříbrné elektrody a srovnávací argentchloridové elektrody.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,73 mg $C_{13}H_{15}NO_2$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

Glyceroli monostearas 40 - 50

Glycerolmonostearat 40% až 50%

CAS 31566-31-1

Je to směs monoacylglycerolů vyšších mastných kyselin, převážně kyseliny stearové a palmitové, s proměnným množstvím di- a triacylglycerolů vyšších mastných kyselin.

Obsahuje 40,0 % až 50,0 % monoacylglycerolů, počítáno jako 2,3-dihydroxypropyloktadekanoat ($C_{21}H_{42}O_4$; M_r 358,56).

Výroba

Vyrábí se z loje získaného ze zvířat, která musí splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro humánní konzumaci. Pokud se pro výrobu použije tkáň bovinního původu, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí tkáně, jež se má použít, se má vzít v úvahu relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské unie "Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosu původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků" (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Vlastnosti

Tuhá voskovitá hmota, prášek nebo vločky. Na dotyk je mastný, bílý až téměř bílý. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% při 60 °C a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.15)*. 54 °C až 64 °C. Předem roztavená zkoušená látka se naplní do kapiláry a nechá se stát 24 h v uzavřené nádobě.

B. 1 g se zahřívá na odpařovací misce s 2 g *hydrogensíranu draselného R*. Vznikají štiplavé, k slzám dráždící páry, které působí tmavnutí filtračního papíru napuštěného *tetrajodortuťnatanem draselným zásaditým RS*.

C. K 2,5 g se přidá 40 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem na vodní lázni. Přidá se 30 ml *vody R*, líh se odpaří, k horkému roztoku se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, ochladí se a protřepe 50 ml *etheru R*. Etherová vrstva se promyje 3krát 10 ml *chloridu sodného RS*, vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se vysuší ve vakuu, roztaví, naplní do kapiláry a nechá stát 24 hod v uzavřené nádobě. Teplota tání *(2.2.15)* je nejméně 53 °C.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 3,0; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 3,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*, 158 až 177; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Volný glycerol. Nejvýše 6,0 %; do 500ml kuželové baňky se zábrusem se odměří 50,0 ml vodného roztoku získaného ve zkoušce Stanovení obsahu. Přidá se 25,0 ml *zkoumadla jodistanového R*, opatrně se protřepe a nechá se stát 30 min při 25 °C až 30 °C. Pak se přidá 12 ml *jodidu draselného RS* a 100 ml *vody R*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška za použití 50 ml *vody R*.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,3 mg glycerolu.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,500 g. Jako rozpouštědlo se použije směs stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu bezvodého R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky. Ke stanovení se použije *kyselina sírová R*.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *dichlormethanu R* v dělicí nálevce se zábrusem. Je-li potřeba, ochladí se. Přidá se 25 ml *vody R*, 1 min se intenzivně protřepává a nechá se stát do úplného oddělení vrstev. Tvoří-li se emulze, přidá se několik kapek *kyseliny octové ledové R*. Vytřepávání se opakuje s 25 ml, s 20 ml a s 20 ml *vody R*. Vodné vrstvy se zfiltrují přes předem *vodou R* zvlhčeným filtrem. Filtr se promyje 2krát 5 ml *vody R*. Filtráty a promývací tekutina se spojí a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Tento roztok se použije ke zkoušce Volný glycerol. Organická vrstva se zfiltruje přes vatu. Dělicí nálevka a filtr se promyjí 3krát 5 ml *dichlormethanu R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí, zředí se *dichlormethanem R* na 100,0 ml a promíchá se (zkoušený roztok). K 50,0 ml zkoušeného roztoku v 500ml kuželové baňce se zábrusem se přidá za opatrného protřepávání 25,0 ml *zkoumadla jodistanového R*. Nechá se 30 min stát při 25 °C až 30 °C, přidá se 12 ml *jodidu draselného RS* a 100 ml *vody R*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS*. Provede se slepá zkouška za použití 50 ml *dichlormethanu R* místo zkoušeného roztoku. Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* činí nejméně 85 % objemu spotřebovaného při slepé zkoušce.

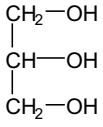
1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,9 mg $C_{21}H_{42}O_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Glycerolum

Glycerol



$C_3H_8O_3$ M_r 92,09 CAS 56-81-5

Je to 1,2,3-propantriol. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_3H_8O_3$.

Vlastnosti

Sirupovitá kapalina, na omak kluzká, bezbarvá nebo téměř bezbarvá, čirá, silně hygroskopická. Je mísitelný s vodou a s lihem 96%, těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných olejích a v silicích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 5 ml se přidá 1 ml *vody R* a opatrně se promíchá. Roztok se zkouší infračervenou spektrometrií *(2.2.24)*. Infračervené absorpční spektrum zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. glycerolu (85%).*

C. 1 ml se smíchá s 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a směs se převrství 0,5 ml *dichromanu draselného RS*. Na styku obou vrstev vznikne modrý prstenec, který do 10 min nedifunduje do spodní vrstvy.

D. 1 ml se na odpařovací misce zahřívá s 2 g *hydrogensíranu draselného R*. Vyvíjejí se štiplavé, k slzám dráždící páry, které způsobí zčernání filtračního papíru napuštěného *tetrajodortuťnatanem draselným zásaditým RS*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 50,0 g se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 25 ml; tento roztok je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Na změnu barvy indikátoru do růžova se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Ztitrovaný roztok se použije ke zkoušce Estery.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,470 až 1,475.

Aldehydy a redukující látky. K 7,5 ml roztoku S se v baňce se zabroušenou zátkou přidá 7,5 ml *vody R* a 1,0 ml *fuchsinu RS*. Baňka se uzavře a nechá se stát 1 h. Roztok není zbarven intenzivněji než současně stejným způsobem připravený porovnávací roztok obsahující 7,5 ml základního *roztoku formaldehydu (5 µl CH₂O/ml)* a 7,5 ml *vody R*. Zkouška nelze hodnotit, jestliže porovnávací roztok není růžový.

Estery. Ke ztitrovanému roztoku ze zkoušky Kysele nebo zásaditě reagující látky se přidá *hydroxid sodný 0,1 mol/l VS* tak, aby jeho celkově přidaný objem byl 10,0 ml. Vaří se 5 min pod zpětným chladičem, ochladí se, přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 8,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*.

Halogenované sloučeniny. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, 5 ml *vody R* a 50 mg *niklu Raneyova R*. Zahřívá se 10 min na vodní lázni, nechá se vychladnout a zfiltruje se. Baňka a filtr se oplachují *vodou R*, až objem filtrátu činí 25 ml. K 5 ml filtrátu se přidají 4 ml *lihu 96% R*, 2,5 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a 0,05 ml *dusičnanu stříbrného RS2,* promíchá se a nechá se 2 min stát. Roztok neopalizuje intenzivněji než současně připravený porovnávací roztok připravený smícháním 7,0 ml základního *roztoku chloridů (5 µg Cl/ml)*, 4 ml *lihu 96% R*, 0,5 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a 0,05 ml *dusičnanu stříbrného RS2* (35 µg/g).

Cukry. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* prostého uhličitanů (připraví se postupem popsaným pro *hydroxid sodný 1 mol/l VS* prostý uhličitanů (*4.2.2*)), promíchá se a po kapkách se přidá 1 ml čerstvě připraveného *síranu měďnatého RS;* vznikne čirý modrý roztok, který se během zahřívání na vodní lázni po dobu 5 min neodbarví ani nevznikne sraženina.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml; tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (10 µg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 1 ml základního *roztoku chloridů (5 µg Cl/ml)*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 6 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce A na těžké kovy (5 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 1,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,01 %; 5,00 g se zahřeje k varu a vyžíhá se.

Stanovení obsahu

Asi 0,1000 g se dobře promíchá se 45 ml *vody R*. Přidá se 25,0 ml roztoku *jodistanu sodného R* (21,4 g/l) a nechá se 15 min stát za chránění před světlem. Pak se přidá 5,0 ml roztoku *ethylenglykolu R* (500 g/l) a nechá se stát 20 min za chránění před světlem. Po přidání 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,21 mg $C_3H_8O_3$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Glycerolum 85%

Glycerol 85%

Je to vodný roztok, který obsahuje 83,5 % až 88,5 % 1,2,3-propantriolu ($C_3H_8O_3$; M_r 92,09).

Vlastnosti

Sirupovitá kapalina, na omak kluzká, bezbarvá nebo téměř bezbarvá, čirá, silně hygroskopická. Je mísitelný s vodou a s lihem 96%, těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných olejích a v silicích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. glycerolu (85%).*

C. 1 ml se smíchá s 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a směs se převrství 0,5 ml *dichromanu draselného RS*. Na styku obou vrstev vznikne modrý prstenec, který do 10 min nedifunduje do spodní vrstvy.

D. 1 ml se na odpařovací misce zahřívá s 2 g *hydrogensíranu draselného R*. Vyvíjejí se štiplavé, k slzám dráždící páry, které způsobí zčernání filtračního papíru napuštěného *tetrajodortuťnatanem draselným zásaditým RS*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 58,0 g se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 25 ml; tento roztok je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Na změnu zbarvení indikátoru do růžova se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Ztitrovaný roztok se použije ke zkoušce Estery.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,449 až 1,455.

Aldehydy a redukující látky. K 7,5 ml roztoku S se v baňce se zabroušenou zátkou přidá 7,5 ml *vody R* a 1,0 ml *fuchsinu RS*. Baňka se uzavře a nechá se stát 1 h. Roztok není zbarven intenzivněji než současně stejným způsobem připravený porovnávací roztok obsahující 7,5 ml základního *roztoku formaldehydu (5 µl CH₂O/ml)* a 7,5 ml *vody R*. Zkouška nelze hodnotit, jestliže porovnávací roztok není růžový.

Estery. Ke ztitrovanému roztoku ze zkoušky Kysele nebo zásaditě reagující látky se přidá *hydroxid sodný 0,1 mol/l VS* tak, aby jeho celkově přidaný objem byl 10,0 ml. Vaří se 5 min pod zpětným chladičem, ochladí se, přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou*

0,1 mol/l VS. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 8,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Halogenované sloučeniny. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, 5 ml *vody R* a 50 mg *niklu Raneyova R.* Zahřívá se 10 min na vodní lázni, nechá se vychladnout a zfiltruje se. Baňka a filtr se oplachují *vodou R*, až objem filtrátu činí 25 ml. K 5 ml filtrátu se přidají 4 ml *lihu 96% R*, 2,5 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a 0,05 ml *dusičnanu stříbrného RS2,* promíchá se a nechá se 2 min stát. Roztok neopalizuje intenzivněji než současně připravený porovnávací roztok připravený smícháním 7,0 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*, 4 ml *lihu 96% R*, 0,5 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a 0,05 ml *dusičnanu stříbrného RS2* (30 μg/g).

Cukry. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Přidají se 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* prostého uhličitanů (připraví se postupem popsaným pro *hydroxid sodný 1 mol/l VS* prostý uhličitanů *(4.2.2)*), promíchá se a po kapkách se přidá 1 ml čerstvě připraveného *síranu měďnatého RS;* vznikne čirý modrý roztok, který se během zahřívání na vodní lázni po dobu 5 min neodbarví ani nevznikne sraženina.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml; tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 1 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 6 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce A na těžké kovy (5 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 12,0 % až 16,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,01 %; 5,00 g se zahřeje k varu a vyžíhá se.

Stanovení obsahu

Asi 0,1000 g se dobře promíchá se 45 ml *vody R.* Přidá se 25,0 ml roztoku *jodistanu sodného R* (21,4 g/l) a nechá se 15 min stát za chránění před světlem. Pak se přidá 5,0 ml roztoku *ethylenglykolu R* (500 g/l) a nechá se stát 20 min za chránění před světlem. Přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS.* Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,21 mg $C_3H_8O_3$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Glyceromacrogoli 350 cocoas

Glyceromakrogol-350-kokoat

Synonymum. Macrogoli 7 glyceroli cocoas

Je to směs mono-, di- a triesterů oxyethylenovaného glycerolu s mastnými kyselinami rostlinného původu obsažených v oleji extrahovaném z tvrdé usušené části endospermu druhu *Cocos nucifera L.* Průměrný obsah oxyethylenových jednotek je 7 jednotek na molekulu.

Vlastnosti

Čirá nažloutlá olejovitá kapalina. Je dobře rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v petroletheru. Relativní hustota je asi 1,05.

Zkoušky totožnosti

A. 1,0 g se rozpustí v 99 g směsi objemových dílů *2-propanolu R* a *vody R* (10 + 90). Čirý roztok se zahřeje na asi 65 °C; vznikne zákal. Pak se ochlazuje až na teplotu, kdy zákal zmizí. Teplota zákalu je 35 °C až 54 °C.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_2$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Zásaditě reagující látky. 2,0 g se rozpustí v horké směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 5,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. 170 až 210.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 85 až 105; stanoví se s 2,0 g zkoušené látky.

Složení mastných kyselin. Provede se zkouška na Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií *(2.4.22)*. Složení mastných kyselin olejového podílu je následující:
- kyselina kapronová: nejvýše 1,0 %,
- kyselina kaprylová: 5,0 % až 10,0 %,
- kyselina kaprinová: 4,0 % až 10,0 %,
- kyselina laurová: 40,0 % až 55,0 %,
- kyselina myristová: 14,0 % až 23,0 %,
- kyselina palmitová: 8,0 % až 12,0 %,
- kyselina stearová: 1,0 % až 5,0 %,
- kyselina olejová: 5,0 % až 10,0 %,
- kyselina linolová: nejvýše 3,0 %.

1,4-Dioxan. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se postupem uvedeným ve stati Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do vhodné lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, a je-li třeba, zahřívá se 10 min při 50 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do vhodné lahvičky, přidá se 0,20 g ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R*. Je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.
Porovnávací roztok (b). K 0,1 g *ethylenoxidu RS* v lahvičce vhodné velikosti se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou a zátka se upevní hliníkovým nebo teflonovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Nástřik statického head-space postupu se obvykle provádí za použití:
- rovnovážné teploty: nejméně 70 °C,
- doby ohřevu: 45 min,
- teploty převodové kapiláry: 75 °C,
- nosného plynu: *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R*,
- doby tlakování: 30 s,
- objemu nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné kolony nebo kolony z křemenného skla délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0 μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 2,0 a jestliže poměr signálu píku ethylenoxidu na stejném chromatogramu k signálu šumu je nejméně 10.

Nastříkne se odděleně vhodný objem (např. 1 ml) plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Postup se opakuje ještě dvakrát. Na chromatogramu zkoušeného roztoku průměrná plocha píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina průměrné plochy píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch píků tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 15 %.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T}{(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,5 g se rozpustí v 25 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených, zcela naplněných obalech.

Glyceromacrogoli hydroxystearas

Glyceromakrogolhydroxystearat

Synonymum. Macrogolglyceroli hydroxystearas

Je to polyoxyethylenovaný hydrogenovaný ricinový olej obsahující hlavně trihydroxystearylglycerol, oxyethylenovaný 7 až 60 molekulami ethylenoxidu (jmenovitá hodnota). Může obsahovat malá množství makrogolhydroxystearatu a odpovídající množství volných glykolů. Vzniká při reakci hydrogenovaného ricinového oleje s ethylenoxidem.

Vlastnosti

Glyceromakrogolhydroxystearat s menším počtem oxyethylenových jednotek na molekulu než 10 je nažloutlá, zakalená, viskózní kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a dispergovatelný v lihu 96%.

Glyceromakrogolhydroxystearat s větším počtem oxyethylenových jednotek na molekulu než 20 je bílá nebo nažloutlá hmota polotekuté nebo pastovité konzistence, snadno rozpustná ve vodě, v lihu 96%, v acetonu a prakticky nerozpustná v petroletheru.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu.

Zkoušený roztok. K 1 g se přidá 100 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (100 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a roztok se okyselí 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se pak protřepe s 50 ml *etheru R* a po rozdělení vrstev se 10 ml čiré horní vrstvy převede do vhodné zkumavky a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 1,0 ml *etheru R*.

Porovnávací roztok. 40,0 mg *kyseliny 12-hydroxystearové R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 2 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *dichlormethanu R, kyseliny octové ledové R* a *acetonu R* (10 + 40 +

+ 50) po dráze 8 cm. Pak se vrstva usuší v proudu studeného vzduchu, postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá asi 10 min při 120 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a zbarvením s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 2 g se přenesou do zkumavky, přidá se 0,2 ml *kyseliny sírové R* a zkumavka se uzavře zátkou opatřenou skleněnou trubičkou dvakrát ohnutou do pravého úhlu. Zkumavka se zahřívá až do tvorby par, které se zavádějí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* tvoří se bílá sraženina. Páry mění zbarvení papíru impregnovaného *tetrajodortuťnatanem draselným zásaditým RS* do černa.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g glyceromakrogolhydroxystearatu s počtem ethylenoxidových jednotek v molekule menším než 10 se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonu R* a *ethanolu R* (50 + 50) a zředí se touto směsí na 50 ml.

5,0 g glyceromakrogolhydroxystearatu s počtem ethylenoxidových jednotek v molekule větším než 20 se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok není modrý.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 5.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Počet oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota)	Číslo hydroxylové	Číslo zmýdelnění
7	115 až 135	125 až 140
25	70 až 90	70 až 90
40	60 až 80	45 až 69
60	45 až 67	40 až 51

1,4-Dioxan. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se postupem uvedeným ve stati Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*.

Volný ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (M_T) se přenese do vhodné lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, a je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (a). 1,00 g (M_R) zkoušené látky se přenese do lahvičky vhodného objemu, přidá se 0,20 g ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R*. Je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (b). K 0,1 g *ethylenoxidu RS* v lahvičce vhodné velikosti se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou a zátka se upevní hliníkovým nebo teflonovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Nástřik statického head-space postupu se obvykle provádí za použití:
- rovnovážné teploty: nejméně 70 °C,
- doby ohřevu: 45 min,
- teploty převodové kapiláry: 75 °C,
- nosného plynu: *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R*,
- doby tlakování: 30 s,
- objemu nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné kolony nebo kolony z křemenného skla délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0 μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 2,0 a jestliže poměr signálu píku ethylenoxidu na stejném chromatogramu k signálu šumu je nejméně 10.

Nastříkne se odděleně vhodný objem (např. 1 ml) plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Postup se opakuje ještě dvakrát. Na chromatogramu zkoušeného roztoku průměrná plocha píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina průměrné plochy píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní standardní odchylka ploch tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) není větší než 15 %.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T}{(A_R \,.\, M_T) - (A_T \,.\, M_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 5,0 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonu R* a *ethanolu R* a zředí se stejnou směsí na 50 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základní *roztoku olova (2 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede počet oxyethylenových jednotek na molekulu hydrogenovaného ricinového oleje (jmenovitá hodnota).

Glyceromacrogoli ricinoleas

Glyceromakrogolricinoleat

Synonymum. Macrogolglyceroli ricinoleas

Je to polyoxyethylenovaný ricinový olej obsahující většinou ricinoleylglycerol oxyethylenovaný 30 až 50 molekulami ethylenoxidu (jmenovitá hodnota), s malým množstvím makrogolricinoleatu a odpovídajících volných glykolů. Vzniká při reakci ricinového oleje s ethylenoxidem.

Vlastnosti

Čirá žlutá viskózní kapalina. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu a snadno rozpustný v lihu 96%.

Relativní hustota je asi 1,05 a viskozita při 25 °C je 500 mPa.s až 800 mPa.s.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu.

Zkoušený roztok. K 1 g se přidá 100 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (100 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit a roztok se okyselí 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se pak protřepe s 50 ml *etheru R* a po rozdělení vrstev se 10 ml čiré horní vrstvy převede do vhodné zkumavky a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 1,0 ml *etheru R*.

Porovnávací roztok. 40,0 mg *kyseliny ricinolejové R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 2 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *dichlormethanu R, kyseliny octové ledové R* a *acetonu R* (10 + 40 + + 50) po dráze 8 cm. Pak se vrstva usuší v proudu studeného vzduchu, postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá asi 10 min při 120 °C. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku se shodují polohou a zbarvením se skvrnami na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 2 g se přenesou do zkumavky, přidá se 0,2 ml *kyseliny sírové R* a zkumavka se uzavře zátkou opatřenou skleněnou trubičkou dvakrát ohnutou do pravého úhlu. Zkumavka se zahřívá až do tvorby par, které se zavádějí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* tvoří se bílá sraženina. Páry mění zbarvení papíru impregnovaného *tetrajodortuťnatanem draselným zásaditým RS* do černa.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. 2,0 g se rozpustí v horké směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 25 až 35.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Počet oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota)	Číslo hydroxylové	Číslo zmýdelnění
30 až 35 50	65 až 82 48 až 68	60 až 75 38 až 52

1,4-Dioxan. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se postupem uvedeným ve stati Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*.

Volný ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (M_T) se přenese do vhodné lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, a je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (a). 1,00 g (M_R) zkoušené látky se přenese do vhodné lahvičky, přidá se 0,20 g ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R*. Je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (b). K 0,1 g *ethylenoxidu RS* v lahvičce vhodné velikosti se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou a zátka se upevní hliníkovým nebo teflonovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Nástřik statického head-space postupu se obvykle provádí za použití:
- rovnovážné teploty: nejméně 70 °C,
- doby ohřevu: 45 min,
- teploty převodové kapiláry: 75 °C,
- nosného plynu: *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R*,
- doby tlakování: 30 s,
- objemu nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné kolony nebo kolony z křemenného skla délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0 μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 2,0 a jestliže poměr signálu píku ethylenoxidu na stejném chromatogramu k signálu šumu je nejméně 10.

Nastříkne se odděleně vhodný objem (např. 1 ml) plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Postup se opakuje ještě dvakrát. Na chromatogramu zkoušeného roztoku průměrná plocha píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina průměrné plochy píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch píků tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) není větší než 15 %.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T}{(A_R \,.\, M_T) - (A_T \,.\, M_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S, je-li třeba zfiltrovaného, vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základní *roztoku olova (2 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřeném obalu, chráněn před světlem.

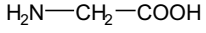
Označování

V označení na obalu se uvede počet oxyethylenových jednotek na molekulu ricinového oleje (jmenovitá hodnota).

Glycinum

Glycin

Synonyma. Acidum aminoaceticum, Glycocolum, kyselina aminooctová



$C_2H_5NO_2$ M_r 75,07 CAS 56-40-6

Je to kyselina 2-aminoethanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_2H_5NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *glycinu CRL*. Zkouší se tablety připravené za použití asi 1 mg látek na 0,4 g *bromidu draselného R.* Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *lihu R* 60% (*V/V*), odpaří se do sucha a zaznamenají se nová spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *glycinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *1-propanolu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší 10 min při 100 °C až 105 °C, potom se postříká roztokem *ninhydrinu R* (2 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *1-butanolu R* (5 + 95) a 2 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou, zbarvením a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *chlornanu sodného RS* a 2 min se vaří. Pak se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a vaří se 4 min až 5 min. Dále se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 ml roztoku *resorcinolu R* (20 g/l), vaří se 1 min, ochladí se, přidá se 10 ml *vody R* a promíchá se. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 6 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* roztok je fialový se zelenožlutou fluorescencí. Po několika minutách se barva mění na oranžovou a pak žlutou. Intenzivní fluorescence zůstává.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,9 až 6,4; měří se 10 ml roztoku S zředěného *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,67 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (75 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

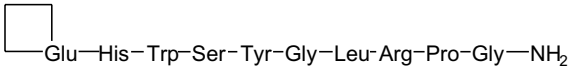
70,0 mg se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a přidá se 30 ml *kyseliny octové ledové R*. Ihned po rozpuštění se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 7,51 mg $C_2H_5NO_2$.

---

† Gonadorelinum

Gonadorelin



$C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$ M_r 1182,30 CAS 33515-09-2

Je to peptid hypotalamu povzbuzující uvolnění hormonu stimulujícího folikuly a luteinizačního hormonu z hypofýzy. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 88,0 % až 98,0 % peptidu $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$. Získává se syntézou a je používán také ve formě octanu nebo chloridu.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutle bílý prášek. Je rozpustný ve vodě a v 1% (*V/V*) roztoku kyseliny octové ledové, mírně rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Poloha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušek A a B na Příbuzné peptidy. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Roztok (10 g/l) je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -54° až -63°, přepočteno na stanovený obsah peptidu. Měří se roztok připravený rozpuštěním 10 mg v 1,0 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 1% (*V/V*).

Absorbance. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) měřená v maximu při 278 nm je 0,55 až 0,59, přepočteno na stanovený obsah peptidu.

Aminokyseliny. Stanoví se analyzátorem aminokyselin za použití *DL-norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se nastaví směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a L-forem následujících aminokyselin: lysin, histidin, arginin, kyselina asparagová, threonin, serin, kyselina glutamová, prolin, alanin, valin, methionin, isoleucin, leucin, tyrosin a fenylalanin, a polovinu ekvimolárního množství L-cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 30 mg *DL-norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 1,0 mg se naváží do pečlivě vymyté zkumavky z tvrzeného skla délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Přidá se přesně odměřený objem roztoku vnitřního standardu obsahující takové množství *DL-norleucinu R*, které odpovídá polovičnímu očekávanému množství molů gonadorelinu. Zkumavka se vloží do mrazicí směsi při -5 °C, tlak se sníží pod 0,133 kPa a zkumavka se těsně uzavře. Poté se 16 h zahřívá na 110 °C až 115 °C. Zkumavka se po ochlazení otevře a její obsah se převede do 10ml odměrné baňky pomocí pěti dávek *vody R,* každé po 0,2 ml. Vysuší se za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R*, zbytek se rozpustí ve *vodě R* a znovu se vysuší za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R* a potom se tento postup ještě jednou opakuje. Zbytek se rozpustí ve vhodném tlumivém roztoku o pH 2,2 a zředí se jím na vhodný objem.

Do analyzátoru aminokyselin se přesně odměří vhodné množství zkoušeného roztoku tak, aby píky aminokyselin přítomných ve větších množstvích zaujímaly většinu stupnice záznamu.

Obsah jednotlivých aminokyselin se vyjádří v molech. Relativní zastoupení aminokyselin se vypočítá z předpokladu, že jedna sedmina součtu molů histidinu, kyseliny glutamové, leucinu, prolinu, glycinu a argininu se rovná 1. Hodnoty pro jednotlivé aminokyseliny jsou v těchto rozmezích: serin 0,7 až 1,05; kyselina glutamová 0,95 až 1,05; prolin 0,95 až 1,05; glycin 1,9 až 2,1; leucin 0,9 až 1,1; tyrosin 0,7 až 1,05; histidin 0,95 až 1,05; arginin 0,95 až 1,05. Lysin a isoleucin nejsou přítomny, ostatní aminokyseliny jsou přítomny jen ve stopách.

Stanovení lze hodnotit, neliší-li se nalezený počet molů norleucinu po opravě na množství použitého roztoku o více než ±5 % od množství přidaného ke zkoušené látce před hydrolýzou.

Příbuzné peptidy.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 5,0 mg se rozpustí v 0,5 ml *vody R.*
Zkoušený roztok (b). 100 µl zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 1,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 µl zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 1,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 mg *gonadorelinu CRL* se rozpustí v 1,0 ml *vody R.*

Na vrstvu se nanese po 10 µl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *methanolu R*, *vody R* a *kyseliny octové ledové R* (60 + 45 + 14 + 6) po dráze 15 cm. Vrstva se 5 min suší. Na dno chromatografické komory se vloží odpařovací miska se směsí 10 ml roztoku *manganistanu draselného R* (50 g/l) a 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, komora

se uzavře a nechá se stát. Do komory se vloží suchá vrstva a komora se uzavře. Za 2 min působení chloru se vyjme a vloží se do proudu chladného vzduchu na tak dlouho, dokud se neodstraní přebytek chloru a plocha pod místy nanesení roztoků nedává již modré zbarvení s 0,05 ml *škrobu s jodidem draselným RS*. Vrstva se postříká *škrobem s jodidem draselným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %).

B. Provádí se shodně jako postup A, ale za použití jiné mobilní fáze, jíž je směs objemových dílů *amoniaku 26% RS*, *methanolu R* a *chloroformu R* (20 + 45 + 60). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %).

Voda. Nejvýše 7,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*), za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu. *Použije se suché sklo, které se může ošetřit silikonem.*

Roztok vnitřního standardu. 50 µl *methanolu bezvodého R* se smíchá s *2-propanolem R1* a zředí se jím na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 4,0 mg se rozpustí v 1,0 ml *2-propanolu R1*.
Zkoušený roztok (b). 4,0 mg se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. K 50 ml roztoku vnitřního standardu se přidá 10 µl *vody R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (180 µm až 250 µm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- tepelně vodivostního detektoru,

Teplota kolony se udržuje při 120 °C a detektoru při 150 °C.

Nastříkne se vhodné množství každého roztoku. Obsah vody se vypočítá za předpokladu, že hustota vody (*2.2.5*) při 20 °C je 0,9972 g/ml a odečte se množství vody stanovené v roztoku vnitřního standardu.

Kyselina octová. Je-li přípravek ve formě octanu, vyhovuje následující dodatečné zkoušce.

Nejvýše 7,5 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *dioxanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok (a). 20,0 mg se rozpustí v 1,0 ml *vody R*.
Zkoušený roztok (b). 20,0 mg se rozpustí v 1,0 ml *vody R* a přidá se 10 µl *dioxanu R*.
Porovnávací roztok. 1,0 mg *kyseliny octové ledové R* se zředí 1,0 ml *vody R* a přidá se 10 µl *dioxanu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 µm až 180 µm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje při 150 °C.

Chloridy (*2.4.4*). Je-li přípravek ve formě hydrochloridu, vyhovuje následující dodatečné zkoušce.

Nejvýše 6 %. 0,83 mg se rozpustí v 15 ml *vody R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 1,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny fosforečné* (10 g/l), jejíž pH bylo *triethylaminem R* upraveno na 3,0, (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok. 1,0 mg *gonadorelinu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny fosforečné* (10 g/l), jejíž pH bylo *triethylaminem R* upraveno na 3,0, (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml,

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, která je směsí objemových dílů roztoku *kyseliny fosforečné* (10 g/l), jejíž pH bylo *triethylaminem R* upraveno na 3,0, a *acetonitrilu R* (75 + 25); poměr složek směsi se upraví tak, aby retenční čas gonadorelinu byl asi 10 min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastřikuje se odděleně 20 µl každého roztoku.

Obsah peptidu $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$ se vypočítá porovnáním s deklarovaným obsahem $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$ v *gonadorelinu CRL*. Zkoušku lze hodnotit, dosahuje-li počet teoretických pater hodnoty nejméně 20 000 na metr.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- množství peptidů v obalu,
- podmínky uchovávání,
- zda je látka ve formě octanu nebo chloridu.

† Gonadotropinum chorionicum

Choriový gonadotropin

CAS 9002-61-3

Je to suchý přípravek, který obsahuje placentární glykoproteiny s luteinizačním účinkem. Účinnost je nejméně 2500 m.j. v miligramu.

Výroba

Extrahuje se z moči těhotných žen vhodnými frakcionačními postupy a suší se v podtlaku nebo se lyofilizuje. Připravuje se v podmínkách, které omezují nebo vylučují bakteriální a virovou kontaminaci. Výrobní postup prokazatelně snižuje jakoukoli virovou kontaminaci, jako virem hepatitidy nebo HIV, vhodnými validovanými metodami.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý amorfní prášek. Je rozpustný ve vodě.

Zkouška totožnosti

Podá-li se infantilním potkanům, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, vyvolá zvýšení hmotnosti semenných váčků a prostaty.

Zkoušky na čistotu

Voda. Nejvýše 5 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu. *Použije se suché sklo, které se může ošetřit silikonem.*

Roztok vnitřního standardu. 15 μl *methanolu bezvodého R* se zředí *2-propanolem R1* na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 4 mg se rozpustí v 0,5 ml *2-propanolu R1*.
Zkoušený roztok (b). 4 mg se rozpustí v 0,5 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 10 μl *vody R* se přidá k 50 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen kopolymerem R* (180 μm až 250 μm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- tepelně vodivostního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota detektoru 150 °C.

Nastříkne se zvolené množství každého roztoku. Obsah vody se vypočítá za předpokladu, že hustota vody (*2.2.5*) při 20 °C je 0,9972 g/ml a odečte se množství vody stanovené v roztoku vnitřního standardu.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne nitrožilně množství odpovídající 300 m.j. rozpuštěné nejvýše v 1 ml sterilního roztoku chloridu sodného (9 g/l) prostého pyrogenních látek.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví za daných podmínek porovnáváním účinku zkoušené látky na zvýšení hmotnosti semenných váčků (nebo prostaty) infantilních potkanů se stejným účinkem mezinárodního standardu choriového gonadotropinu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje směs lyofilizovaného extraktu choriového gonadotropinu z moči těhotných žen s lak

tosou. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Použijí se infantilní samci stejného kmene potkana ve stáří 19 až 28 dní, jejichž rozdíl ve stáří činí nejvýše 3 dny a největší rozdíl v hmotnosti nejtěžšího a nejlehčího potkana je 10 g. Potkani se náhodně rozdělí do šesti stejných skupin po nejméně pěti zvířatech. Pokud je dosažitelný vrh o šesti zvířatech, rozdělí se tato zvířata do všech skupin a označí se.

Zvolí se tři dávky referenčního přípravku a tři dávky zkoušeného přípravku tak, aby nejnižší dávka postačovala k vyvolání pozitivní odpovědi u některých potkanů a nejvyšší dávka k vyvolání největší odpovědi u celé skupiny potkanů. Použijí se dávky v geometrické řadě. V předběžné zkoušce se použije přibližná výchozí hodnota celkových dávek 4 m.j., 8 m.j. a 16 m.j. Použité dávky budou závislé na citlivosti použitých zvířat, která může značně kolísat.

Celková množství zkoušeného přípravku a referenčního přípravku, která odpovídají denním dávkám, se odděleně rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnan-albuminovém o pH 7,2 R* tak, aby denní dávka byla podávána v objemu asi 0,5 ml. Přidá se vhodná protimikrobní konzervační látka, jako např. fenol (4 g/l) nebo thiomersal (0,02 g/l). Roztoky se uchovávají při teplotě (5 ± 3) °C.

Během následujících 4 dnů se každému zvířeti příslušné skupiny vstřikuje podkožně v pravidelném čase denní dávka. Pátý den za 24 h po posledním podání se potkani usmrtí a vyjmou se semenné váčky. Cizí tekutiny a tkáně se odstraní a váčky se ihned zváží. Výsledky se vypočítají běžnými statistickými metodami. Jako odpověď se použije hmotnost váčků. (K přesnosti zkoušky se může použít vhodné srovnání hmotnosti orgánu s hmotností zvířete a může být použita kovarianční analýza).

Zjištěná účinnost je nejméně 80 % a nejvýše 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) zjištěné účinnosti je nejméně 64 % a nejvýše 156 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných, zabezpečených obalech, chráněn před světlem a při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v obalu,
- účinnost v mezinárodních jednotkách na miligram,
- zda je látka sterilní.

† Gonadotropinum sericum equinum ad usum veterinarium

Koňský sérový gonadotropin pro veterinární použití

Je to suchý přípravek glykoproteinové frakce získaný ze séra nebo plazmy březích klisen s luteinizačním a folikuly stimulujícím účinkem. Může být připraven srážením ethanolem (70 % *V/V*) a dalším čištěním vhodným chromatografickým postupem. Počítáno na bezvodou látku, je gonadotropinová účinnost nejméně 1000 m.j. v miligramu. Koňský sérový gonadotropin se připravuje v podmínkách, které omezují mikrobiální kontaminaci.

Vlastnosti

Bílý až světle šedý amorfní prášek. Je rozpustný ve vodě.

Zkouška totožnosti

Podá-li se infantilním samicím potkana, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, vyvolá zvětšení hmotnosti vaječníků.

Zkoušky na čistotu

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 10,0 %, provede se s 80 mg zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku obsahujícího v mililitru sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) 500 m.j.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví za daných podmínek porovnáním účinku zkoušené látky na zvýšení hmotnosti vaječníků infantilních potkaních samic se stejným účinkem mezinárodního standardu koňského sérového gonadotropinu nebo referenčního přípravku, kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje směs lyofilizovaného extraktu gonadotropinu ze séra březích klisen s laktosou. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Použijí se infantilní samice stejného kmene potkana 21 až 28 dní staré, jejichž rozdíly ve stáří jsou nejvýše 3 dny a největší rozdíl v hmotnosti nejtěžší a nejlehčí samice je 10 g. Samice se náhodně rozdělí do šesti stejných skupin po nejméně pěti zvířatech. Pokud je dosažitelný vrh o šesti zvířatech, rozdělí se tato zvířata do všech skupin a označí.

Zvolí se tři dávky referenčního přípravku a tři dávky zkoušeného přípravku tak, aby nejnižší dávka postačovala k vyvolání pozitivní odpovědi u některých samic a nejvyšší dávka k vyvolání

největší odpovědi u celé skupiny. Použijí se dávky v geometrické řadě; v předpokusu se použijí dávky s celkovým obsahem 8 m.j., 12 m.j. a 18 m.j.; dávky jsou závislé na citlivosti zvířat, která může velmi kolísat.

Celková množství zkoušeného přípravku a referenčního přípravku, která odpovídají denním dávkám, se odděleně rozpustí v takovém množství sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího v každém mililitru 1 mg *albuminu hovězího R* tak, aby jednotlivé dávky byly obsaženy v objemu asi 0,2 ml. Roztoky se uchovávají při teplotě (5 ± 3) °C.

Všem zvířatům v příslušné skupině se podkožně vstříkne určená dávka. Podání se opakuje za 18 h, 21 h, 24 h, 42 h a 48 h po první injekci. Nejdříve za 40 h a nejdéle za 72 h po poslední injekci se zvířata usmrtí a vyjmou se vaječníky. Odstraní se cizí tekutina a cizí tkáň a vaječníky se ihned zváží. Výsledky se vypočítají běžnými statistickými metodami na základě hmotnosti obou vaječníků každého zvířete jako odpovědi.

Zjištěná účinnost je nejméně 80 % a nejvýše 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) zjištěné účinnosti je nejméně 64 % a nejvýše 156 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilním, vzduchotěsném, zabezpečeném obale.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v miligramu,
- zda je přípravek sterilní,
- zda je přípravek prostý pyrogenních látek.

† Gramicidinum

Gramicidin

CAS 1405-97-6

Je to směs obsahující hlavně tři páry lineárních polypeptidů, obvykle získaných extrakcí z tyrothricinu, komplexu izolovaného z fermentační živné půdy mikroorganismu *Bacillus brevis* Dubos. Hlavní složkou gramicidinu je L-valin v páru s protějškem L-tryptofanem (gramicidin A 1). Počítáno na vysušenou látku, účinnost je nejméně 900 m.j. v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, slabě hygroskopický, prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v cyklohexanu.

Taje při teplotě asi 230 °C.

Zkoušky totožnosti

A. 0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku v rozmezí 240 nm až 320 nm (*2.2.25*). Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 282 nm a 290 nm, prodlevu při asi 275 nm a absorpční minimum při 247 nm. Specifická absorbance v maximu při 282 nm je 105 až 125.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí ve 2,0 ml *lihu 96% R*.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *gramicidinu CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *lihu 96% R*.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *tyrothricinu CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *lihu 96% R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 0,5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *1-butanolu R*, *vody R*, *kyseliny octové R* a *butylacetatu R* (2,5 + 7,5 + 12 + + 20 + 40) po dráze 5 cm. Vrstva se suší 15 min při 125 °C a pak se ponoří do *dimethylaminobenzaldehydu RS2*. Vrstva se zahřívá při 90 °C do objevení skvrn. Hlavní skvrna nebo skupina hlavních skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně nebo skupině hlavních skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a skvrně nebo skupině skvrn s nejvyšší hodnotou R_F na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny nebo dvě zřetelně od sebe oddělené skupiny skvrn.

Zkoušky na čistotu

Absorbance. 0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Stejně se připraví roztok *gramicidinu CRL*. Měří se absorbance obou roztoků v rozmezí 240 nm až 320 nm (*2.2.25*) a vyhodnotí se absorbance v maximu při 282 nm a v minimu při 247 nm. Pro každý roztok se vypočítá rozdíl absorbancí v maximu a v minimu. Počítáno na vysušenou látku, rozdíl vypočítaný u zkoušené látky se neliší o více než 4,0 % od rozdílu vypočítaného pro *gramicidin CRL*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 3,0 %. 1,000 g se 3 h zahřívá při 60 °C ve vakuu nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřesahujícím 0,1 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

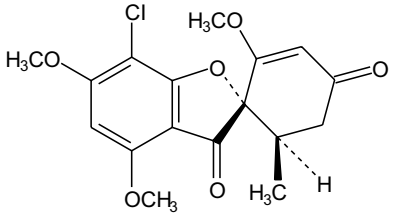
Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití turbidimetrické metody a *gramicidinu CRL*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Griseofulvinum

Griseofulvin



$C_{17}H_{17}ClO_6$ M_r 352,77 CAS 126-07-8

Je to (1′*S*,6′*R*)-7-chlor-2′,4,6-trimethoxy-6′-methylspiro[benzofuran-2(3*H*′),1′-[2]cyklohexen]--3,4′-dion, který je produkován určitými kmeny *Penicillium griseofulvum* nebo připravován jinými způsoby. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{17}H_{17}ClO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý, velmi jemný prášek, o velikosti částic většinou do 5 µm, jen ojediněle přesahujících 30 µm, bez chuti. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu a chloridu uhličitém, těžce rozpustný v ethanolu a methanolu.

Taje při teplotě asi 220 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *griseofulvinu CRL*.

B. Asi 5 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny sírové R* a přidá se asi 5 mg práškovaného *dichromanu draselného R;* vzniká vínově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,75 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok $Ž_4$(*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. 0,25 g se suspenduje ve 20 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +354° až +364°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dimethylformamidu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *difenylanthracenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,2 g *difenylanthracenu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *acetonem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 5,0 mg *griseofulvinu CRL* se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *acetonem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 1 % *poly(kyanopropyl)(methylfenylmethyl)siloxanu R,*
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 50 ml až 60 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 250 °C, teplota nástřikového prostoru na 270 °C a teplota detektoru na 300 °C.

Chromatogramy se vyvíjejí po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času píku odpovídajícího griseofulvinu, který je asi 11 min. Na chromatogramu porovnávacího roztoku se stanoví poměr plochy píku odpovídajícího griseofulvinu k píku odpovídajícímu vnitřnímu standardu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se stanoví poměr plochy píku odpovídajícího dechlorgriseofulvinu (relativní retenční čas vztažený ke griseofulvinu asi 0,6) k ploše píku vnitřního standardu. Právě tak se stanoví poměr plochy píku odpovídajícího dehydrogriseofulvinu (relativní retenční čas vztažený ke griseofulvinu asi 1,4) k ploše píku vnitřního standardu.

Poměry vypočítané z chromatogramu zkoušeného roztoku (b) dělené poměrem vypočítaným z chromatogramu porovnávacího roztoku jsou nejvýše 0,6 pro dechlorgriseofulvin a nejvýše 0,15 pro dehydrogriseofulvin.

Látky rozpustné v etheru petrolejovém. Nejvýše 0,2 %; 1,0 g se protřepe s 20 ml *etheru petrolejového R* a zahřívá se 10 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje a zbytek se třikrát promyje 15 ml *etheru petrolejového R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí a na vodní lázni odpaří do sucha. Zbytek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C a váží nejvýše 2 mg.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Neškodnost. Použije se 5 zdravých myší o hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se podá orálně suspenze 0,1 g zkoušené látky v 0,5 ml až 1 ml *vody R*. Do 48 h po podání suspenze neuhyne žádná myš.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 200,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml a změří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 291 nm.

Vypočítá se obsah $C_{17}H_{17}ClO_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 686.

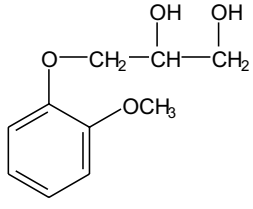
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Guaifenesinum

Guaifenesin

Synonymum. Aether glycerinoguaiacolicus



$C_{10}H_{14}O_4$ M_r 198,22 CAS 93-14-1

Je to (*RS*)-3-(2-methoxyfenoxy)-1,2-propandiol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_{10}H_{14}O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 79 °C až 83 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *guaifenesinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je polohou, zbarvením a velikostí shodná s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, je-li třeba mírným zahřátím, a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1;* ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. K 10 ml roztoku S se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS;* ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy o tloušťce 0,75 mm připravené následovně: 0,3 g *karbomeru R* se smíchá s 240 ml *vody R* a nechá se 1 h stát za mírného míchání. Postupným přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS* za míchání se upraví

pH na hodnotu 7 a přidá se 30 g *silikagelu H R*. Po vysušení na vzduchu po dobu 16 h se zahřívá 1 h při 100 °C až 105 °C, ochladí se a ihned se použije.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *guaifenesinu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R* a *chloridu uhličitého R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se směsí stejných objemových dílů roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (10 g/l), roztoku *chloridu železitého R* (200 g/l) a *lihu 96% R*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Guajakol. Nejvýše 500 μg/g. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml směsi stejných objemových dílů *chloridu železitého RS1*, *vody R* a nechá se 5 min stát. Roztok není intenzivněji zbarven *(2.2.2, Metoda II)* než směs připravená z 0,5 ml základního modrého roztoku, 1,5 ml základního žlutého roztoku, 3,5 ml základního červeného roztoku a 4,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g HCl/l).

Chloridy a monochlorhydriny. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 min se zahřívá na vodní lázni. Po ochlazení se přidají 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy *(2.4.4)* (250 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (25 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití roztoku olova (2 μg Pb/ml) získaného zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (1 + 9).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 20,0 ml *jodistanu sodného RS*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Přidá se 25,0 ml *arsenitanu sodného RS*, 1 ml *jodidu draselného RS* a nechá se 10 min stát. Titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* za použití 2 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 9,911 mg $C_{10}H_{14}O_4$.

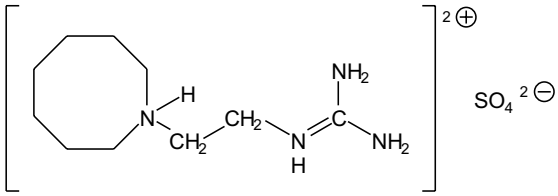
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Guanethidini sulfas

Guanethidiniumsulfat

Synonyma. Guanethidinium sulfuricum, Guanethidini monosulfas



$C_{10}H_{24}N_4O_4S$ M_r 296,38 CAS 645-43-2

Je to 1-(2-guanidinioethyl)perhydroazociniumsulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{24}N_4O_4S$.

Vlastnosti

Bezbarvý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Taje při asi 250 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 25 mg se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 20 ml *trinitrofenolu RS* a zfiltruje se. Sraženina promytá *vodou R* a vysušená při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při asi 154 °C.

B. Asi 25 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 1 ml *1-naftolu RS* a po kapkách za třepání se přidá 0,5 ml *chlornanu sodného RS;* vznikne světle růžová sraženina, která se změní stáním na fialově červenou.

C. Vyhovuje zkouškám na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,4 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S není intenzivněji zabarven než porovnávací barevný roztok ZŽ $_6$*(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,7 až 5,5; měří se roztok S.

Redukující látky. V kuželové baňce se zabroušenou zátkou se rozpustí 1,0 g v 25 ml *vody R,* přidá se 25 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a nechá se 10 min stát. Potom se přidá 1 g *bromidu draselného R* a 1 ml *bromičnanu draselného 0,0083 mol/l VS,* okyselí se 30 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, promíchá se a nechá se stát 5 min ve tmě. Přidají se 2 g *jodidu draselného R*, protřepe se, nechá se 2 min stát a titruje se uvolněný jod *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru. K odbarvení roztoku se spotřebuje nejméně 0,3 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 15 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* (*2.2.20*) za použití 0,1 ml *zeleně malachitové RS* jako indikátoru do vzniku žlutozeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,64 mg $C_{10}H_{24}N_4O_4S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Guar galactomannanum

1998

Galaktomanan guar

CAS 9000-30-0

Získává se parciální hydrolýzou rozemletého endospermu semen druhu *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub.

Hlavní složky jsou polysacharidy složené z D-galaktosy a D-mannosy v molekulárním poměru 1 : 1,4 až 1 : 2. Molekuly obsahují lineární hlavní řetězec ß-(1→4)-glykosidicky vázaných mannopyranos a jednoduchých α-(1→6)-glykosidicky vázaných galaktopyranos.

Vlastnosti

Žlutobílý prášek. Je dobře rozpustný ve studené i horké vodě, prakticky nerozpustný v organických rozpouštědlech.

Zkoušky totožnosti

A. 5 g roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se smíchá s 0,5 ml roztoku *tetraboritanu sodného R* (10 g/l); rychle se vytvoří gel.

B. 20 g roztoku S se zahřívá 10 min ve vodní lázni. Po ochlazení se doplní na původní hmotnost *vodou R;* netvoří se gel.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se v silnostěnné odstřeďovací zkumavce smíchá se 2 ml roztoku *kyseliny trifluoroctové R* (230 g/l), intenzivně se protřepává až do rozpuštění vzniklého gelu a po uzavření zkumavky se zahřívá 1 h při 120 °C. Hydrolyzát se odstřeďuje, čirá supernatantní kapalina se opatrně převede do baňky na 50 ml, přidá se 10 ml *vody R* a roztok se odpaří za

sníženého tlaku do sucha. Odparek se rozpustí v 10 ml *vody R* a znovu se odpaří za sníženého tlaku do sucha. K čirému odparku, který nepáchne po kyselině octové, se přidá 0,1 ml *vody R* a 1 ml *methanolu R*. Odstřeďováním se oddělí amorfní sraženina. Je-li třeba, supernatantní tekutina se zředí *methanolem R* na 1 ml.

Porovnávací roztok. 10 mg *galaktosy R* a 10 mg *mannosy R* se rozpustí ve 2 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 5 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se postříká *zkoumadlem aminohippurovým R* a zahřívá se 5 min při 120 °C.

Dvě zřetelně oddělené hnědavé skvrny v dolní části chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (galaktosa a mannosa podle vzestupných hodnot R_F).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se navlhčí 2 ml *2-propanolu R*. Za stálého míchání se přidá *voda R* do celkové hmotnosti 100 g a míchá se, dokud není látka stejnoměrně dispergována. Pak se nechá stát nejméně 1 h. Je-li viskozita nižší než 200 mPa.s, použije se navážka 3,0 g zkoušené látky.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita (*2.2.8*). Nejméně 75 % a nejvýše 140 % hodnoty uvedené na obalu. Množství odpovídající 2,00 g vysušené látky se navlhčí 2,5 ml *2-propanolu R* a za stálého míchání se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Po 1 h se měří viskozita rotačním viskozimetrem při 20 °C a smykovém poměru $100.s^{-1}$.

Nerozpustné látky. Do baňky na 250 ml se za stálého míchání převede 1,50 g zkoušené látky do směsi 1,6 ml *kyseliny sírové R*, 150 ml *vody R* a zváží se. Baňka se ponoří do vodní lázně a zahřívá se 6 h pod zpětným chladičem a pak se doplní na původní hmotnost *vodou R*. Ještě horký roztok se filtruje předem zváženým filtrem ze slinutého skla (160). Filtr se promyje horkou *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 105 mg (7,0 %).

Bílkovina. Nejvýše 5,0 %; provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou (*2.5.9*) s 0,400 g zkoušené látky. Výsledek se násobí hodnotou 6,25.

Tragant, slizy z rostlin rodu Sterculia, gelosa, algináty, karragenany. Malé množství zkoušené látky se smíchá s 0,2 ml čerstvě připravené *červeně rutheniové RS*. Při pozorování pod mikroskopem nejsou patrny žádné červeně zbarvené útvary.

Ztráta sušením. (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %; 1,000 g se suší 5 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel. (*2.4.16*). Nejvýše 1,8 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky, navlhčené 10 ml *vody R*.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou (*2.6.12*). Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* (*2.6.13*).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

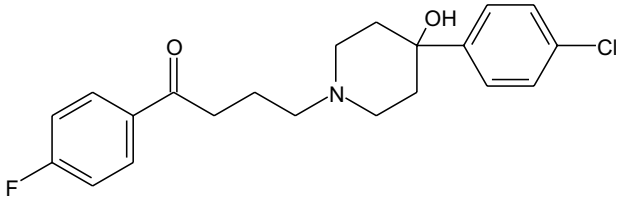
V označení na obalu se uvede zdánlivá viskozita roztoku (20 g/l) v milipascalsekundách.

1800

† Haloperidolum

Haloperidol

1998



$C_{21}H_{23}ClFNO_2$ M_r 375,87 CAS 52-86-8

Je to 4-[4-(4-chlorfenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl]-1-(4-fluorfenyl)-1-butanon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % $C_{21}H_{23}ClFNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, v methanolu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*): 150 °C až 153 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *haloperidolu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *haloperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *haloperidolu CRL* a 10 mg *bromperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *tetrahydrofuranu R, methanolu R* a roztoku *chloridu sodného* (58 g/l) (10 + 45 + 45) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 245 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě skvrny, které nemusí být zcela odděleny.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *ethanolu R*, přidá se 0,5 ml *dinitrobenzenu RS* a 0,5 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS;* vznikne fialové zbarvení, které po 20 min přechází na hnědočervené.

E. K 0,1 g v porcelánovém kelímku se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, 10 min se zahřívá nad otevřeným plamenem a nechá se ochladit. Zbytek se převede do 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí ve 20 ml roztoku *kyseliny mléčné R* 1% *(V/V)*. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *haloperidolu CRL* a 2,5 mg *bromperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 1,0 tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (3 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - roztok *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (17 g/l),
  - *mobilní fáze B* - *acetonitril R*.

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 - 15	90 → 50	10 → 50	lineární gradient
15 - 20	50	50	izokratická eluce
20 - 25	90	10	původní složení eluentu
25 = 0	90	10	znovuspuštění gradientu

- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Kolona se nejméně 30 min ustaluje promýváním *acetonitrilem R* při průtokové rychlosti 1,5 ml/min a potom nejméně 5 min eluentem počátečního složení.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu získaném s 10 μl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy haloperidolu asi 5,5 min a bromperidolu asi 6 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže je rozlišení mezi píky haloperidolu a bromperidolu nejméně 3,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo se upraví doba programu pro lineární gradientovou eluci.

Nastříkne se odděleně 10 μl *methanolu R* jako slepá zkouška, 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího

roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Nepřihlíží se k píkům získaným ve slepé zkoušce a k píkům s plochou menší než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky v platinovém kelímku.

Stanovení obsahu

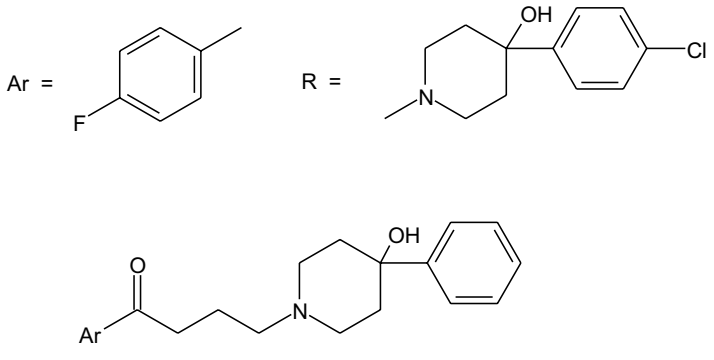
0,300 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,59 mg $C_{21}H_{23}ClFNO_2$.

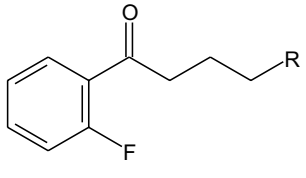
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

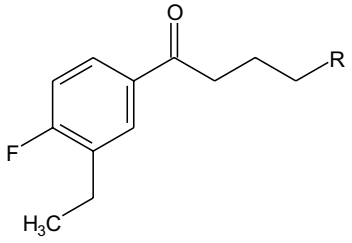
Nečistoty



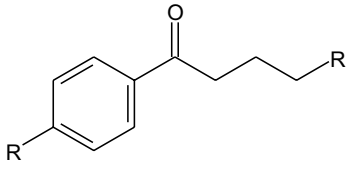
A. 4-(4-fenyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-1-(4-fluorfenyl)butan-1-on,



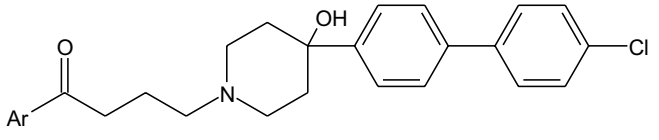
B. 1-(2-fluorfenyl)-4-[4-hydroxy-4-(4-chlorfenyl)-piperidin-1-yl]butan-1-on,



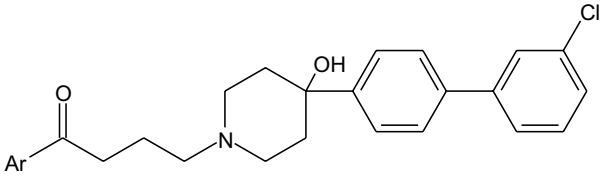
C. 1-(3-ethyl-4-fluorfenyl)-4-[4-hydroxy-4-(4-chlorfenyl)-piperidin-1-yl]butan-1-on,



D. 4-[4-hydroxy-4-(4-chlorfenyl)-piperidin-1-yl]-1-{4-[4-hydroxy-4-(4-chlorfenyl)-piperidin-1--yl]fenyl}butan-1-on,



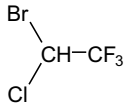
E. 1-(4-fluorfenyl)-4-[4-hydroxy-4-(4′-chlorbifenyl-4-yl)-piperidin-1-yl]butan-1-on,



F. 1-(4-fluorfenyl)-4-[4-hydroxy-4-(3′-chlorbifenyl-4-yl)-piperidin-1-yl]butan-1-on.

Halothanum

Halotan



$C_2HBrClF_3$ M_r 197,38 CAS 151-67-7

Je to (*RS*)-2-brom-1,1,1-trifluor-2-chlorethan stabilizovaný 0,01 % thymolu.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá těkavá těžká nehořlavá kapalina. Je těžce rozpustný ve vodě, mísitelný s ethanolem, s etherem a s trichlorethylenem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Destilační rozmezí, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. halotanu*. Měří se v 0,1mm kyvetě.

C. K 0,1 ml se přidají ve zkumavce 2 ml *terc.butanolu R*. Přidá se 1 ml *edetanu měďnatého RS*, 0,5 ml *amoniaku 26% R* a směs 0,4 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a 1,6 ml *vody R* (roztok a). Současně se připraví kontrolní roztok (roztok b). Obě zkumavky se ponoří na 15 min do vodní lázně při 50 °C, ochladí se a přidá se 0,3 ml *kyseliny octové ledové R*. K 1 ml každého roztoku (a) a (b) se přidá 0,5 ml stejných objemových dílů čerstvě připraveného roztoku *alizarinu RS* a *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS*. Roztok (a) je žlutý, roztok (b) je červený.

K 1 ml každého roztoku (a) a (b) se přidá 1 ml *tlumivého roztoku o pH 5,2*, 1 ml *červeně fenolové RS* zředěné *vodou R* 1 : 10 a 0,1 ml *chloraminu T RS*. Roztok (a) je modrofialový, roztok (b) je žlutý.

Ke 2 ml každého roztoku (a) a (b) se přidá 0,5 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (25 + 75), 0,5 ml *acetonu R* a 0,2 ml roztoku *bromičnanu draselného R* (50 g/l) a protřepe se. Zkumavky se zahřívají 2 min ve vodní lázni při 50 °C, ochladí se a přidá se 0,5 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny dusičné R* a *vody R* a dále 0,5 ml *dusičnanu stříbrného RS2*. Roztok (a) opalizuje a po několika minutách vznikne bílá sraženina, roztok (b) zůstane čirý.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 20 ml se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 3 min se třepe a nechá se stát. Oddělí se vodná vrstva a přidá se 0,2 ml *červeně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* nebo 0,6 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,872 až 1,877.

Destilační rozmezí *(2.2.11)*. 49,0 °C až 51,0 °C; 95 % předestiluje v rozmezí 1,0 °C.

Těkavé příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *trichlortrifluorethanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok (a). Použije se zkoušená látka.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml *trichlortrifluorethanu R* se zředí zkoušenou látkou na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí zkoušenou látkou na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se dále zředí zkoušenou látkou na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 2,75 m a vnitřního průměru 5 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro chromatografii R1* (180 μm až 250 μm), impregnovanou 30 % *makrogolu 400 R* v prvních 1,8 m délky kolony a 30 % *dinonylftalatu R* ve zbytku délky kolony,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C. Nastřikuje se po 5 μl zkoušeného roztoku (a) a (b).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího vnitřnímu standardu, není větší než plocha píku vnitřního standardu korigovaná, je-li třeba, na nečistoty se stejným retenčním časem jako má vnitřní standard (0,005 %).

Bromidy a chloridy. K 10 ml se přidá 20 ml *vody R* a 3 min se třepe. K 5 ml vodné vrstvy se přidá 5 ml *vody R*, 0,05 ml *kyseliny dusičné R* a 0,2 ml *dusičnanu stříbrného RS1*. Roztok neopalizuje intenzivněji než směs 5 ml vodné vrstvy a 5 ml *vody R*.

Brom a chlor. K 10 ml vodné vrstvy získané ve zkoušce Bromidy a chloridy se přidá 1 ml *škrobu s jodidem draselným RS;* nevznikne modré zbarvení.

Thymol. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *mentholu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,10 g *mentholu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 20,0 ml se přidá 5,0 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 20,0 mg *thymolu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml. K 20,0 ml se přidá 5,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony z křemenného skla délky 15 m a vnitřního průměru 0,53 mm pokryté filmem 1,5 μm *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 15 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota nástřikového prostoru na 170 °C a teplota detektoru na 200 °C.

Nastřikuje se odděleně po 1,0 μl roztoku vnitřního standardu, zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je plocha píku odpovídajícího thymolu nejméně 75 % a nejvýše 115 % plochy odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,008 % až 0,012 %).

Netěkavé látky. 50 ml se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek sušený 2 h při 100 °C až 105 °C váží nejvýše 1 mg (20 mg/l).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem při teplotě nepřesahující 25 °C. Při výběru materiálu, ze kterého je vyroben obal, se bere v úvahu reaktivita halothanu s některými kovy.

Nečistoty

A. 1,1,1,4,4,4-hexafluor-2-buten,
B. 1,1,1,4,4,4-hexafluor-2-chlor-2-buten (*cis* a *trans*),
C. 1,1,1,4,4,4-hexafluor-2,3-dichlor-2-buten (*cis* a *trans*),
D. 2-brom-1,1,1,4,4,4-hexafluor-2-buten (*trans*),
E. 1,1,1-trifluor-2-chlorethan,
F. 1,2,2-trifluor-1,1,2-trichlorethan,
G. 1-brom-2,2-difluor-1-chlorethylen,
H. 1,1,1-trifluor-2,2-dichlorethan,
I. 1-brom-2,2,2-trifluor-1,1-dichlorethan,
J. 1,1-difluor-1,2-dichlorethan.

Hamamelidis folium

Vilínový list

Synonymum. Folium hamamelidis

Je to usušený list druhu *Hamamelis virginiana* L. Obsahuje nejméně 7,0 % tříslovin, vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Čepel listu je 5 cm až 12 cm dlouhá a 3 cm až 8 cm široká, široce vejčitá až obvejčitá, na bázi šikmá, nesouměrná, na konci zašpičatělá, zřídka tupá. List je zelený nebo zelenohnědý, často rozlámaný, zmačkaný nebo slisovaný ve více nebo méně kompaktní hmotu. Okraje čepele hrubě pilovité nebo zubaté. Žilnatina zpeřená, na spodní straně listu vyniklá. Obvykle čtyři až šest párů postranních žilek svírá s hlavní žilkou ostrý úhel, na okraji čepele se ohýbají, jemné žilky tak často svírají s postranními žilkami pravý úhel

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky svrchní pokožky s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými; spodní pokožka s průduchy zčásti paracytickými (*2.8.3*), ostatní jsou atypické; hvězdovité krycí chlupy buď celé, nebo polámané jsou tvořeny čtyřmi až dvanácti jednobuněčnými větvemi na bázi srostlými, buňky jsou protáhlé, kuželovité, zakřivené, obvykle až 250 μm dlouhé, se ztlustlými stěnami, s dobře patrným luminem, často s hnědě zbarveným obsahem; průvodní vlákna zdřevnatělá, se stěnami ztlustlými, jednotlivá nebo ve skupinách, provázená komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého; malé válcovité

parenchymatické buňky palisádového parenchymu; nepravidelně tvarované buňky houbového parenchymu; sklereidy často protáhlé na jednom nebo obou koncích, 150 μm až 180 μm dlouhé, celé nebo jejich úlomky; úlomky prstencovitě nebo šroubovitě ztlustlých cév; jednotlivé krystaly šťavelanu vápenatého.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se protřepává 15 min s 10 ml *lihu R* 60% (*V/V*) a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok (a). 30 mg *taninu R* se rozpustí v 5 ml *lihu R* 60% (*V/V*).

Porovnávací roztok (b). 5 mg *kyseliny gallové R* se rozpustí v 5 ml *lihu R* 60% (*V/V*).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *ethylformiatu R* (10 + 10 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká *chloridem železitým RS2* tak, aby byly patrny modrošedé skvrny (fenolické sloučeniny).

V dolní třetině chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna hlavní skvrna odpovídající svojí polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a), v horní části je patrna úzká skvrna odpovídající svojí polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Ve střední části chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další méně intenzivně zbarvené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 7 % stonků a nejvýše 2 % cizích organických příměsí. Stanoví se s 50 g drogy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 7,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí, pokud možno, za ochrany před světlem.

Pro přípravu roztoků se používá voda prostá oxidu uhličitého R.

0,750 g práškované drogy (180) se v kuželové baňce smíchá se 150 ml *vody R*. Zahřeje se k varu a zahřívá se dalších 30 min ve vodní lázni. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje filtračním papírem o průměru 12 cm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Veškeré polyfenoly. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto filtrátu se smíchá se 2,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a *uhličitanem sodným RS* se zředí na 50,0 ml. Přesně 3 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_1) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neadsorbovatelné na kožní prášek. Ke 20,0 ml filtrátu se přidá 0,20 g *kožního prášku CRL* a intenzivně se protřepává 60 min, pak se zfiltruje. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá se 2,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a *uhličitanem sodným RS* se zředí na 50,0 ml. Přesně 3 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_2) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *pyrogallolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá se 2,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a *uhličitanem sodným RS* se zředí na 50,0 ml. Přesně 3 min po přidání posledního roztoku a do 15 min po rozpuštění pyrogallolu se měří absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 715 nm (A_3) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{13{,}12(A_1 - A_2)}{A_3 \cdot m},$$

v němž značí:
m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Harpagophyti radix

Synonymum. Radix harpagophyti

Je to řezaný usušený hlíznatý sekundární kořen druhu *Harpagophytum procumbens* DC. Obsahuje nejméně 1,2 % harpagosidu ($C_{24}H_{30}O_{11}$; M_r 494,5), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga šedohnědá až tmavohnědá, hořké chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Silné plátky vějířovitého nebo okrouhlého tvaru nebo hrubě nalámané kotouče, na povrchu tmavší, podélně brázdité. Na světlejší řezné ploše je patrné tmavé kambium a zřetelně paprsčitě uspořádané dřevní svazky. Centrální cylindr s jemným soustředným vrstvením. Pod lupou jsou na řezu patrna žlutá až hnědočervená zrna.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky korku s velkými, žlutohnědými tenkostěnnými buňkami; úlomky korkového parenchymu s velkými tenkostěnnými buňkami občas obsahují červenohnědá zrna inkluzí a jednotlivé žluté kapky; úlomky žebříčkovitě ztlustlých cév a cévic provázené dřevním parenchymem centrálního cylindru; v parenchymu malé jehlice nebo krystaly šťavelanu vápenatého. Práškovaná droga může obsahovat pravoúhlé nebo mnohohranné tečkované sklereidy s tmavě červenohnědým obsahem. Parenchym se *floroglucinem RS* barví zeleně.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného *silikagelu*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se zahřívá 10 min na vodní lázni při 60 °C s 10 ml *methanolu R*. Zfiltruje se a filtrát se odpaří za sníženého tlaku a teploty nepřevyšující 40 °C na asi 2 ml.

Porovnávací roztok. 1 mg *harpagosidu R* se rozpustí v 1 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (8 + 15 + 77) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Ve střední části chromatogramů zkoušeného i porovnávacího roztoku je patrna skvrna harpagosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrny další zřetelné skvrny, převážně nad skvrnou harpagosidu. Vrstva se postříká roztokem *floroglucinu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* a pak *kyselinou chlorovodíkovou R.* Vrstva se suší 5 min až 10 min při 80 °C. Na chromatogramu zkoušeného i porovnávacího roztoku je zelená skvrna harpagosidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik žlutých až hnědých skvrn pod a nad skvrnou odpovídající harpagosidu.

Zkoušky na čistotu

Škrob. Práškovaná droga se pozoruje pod mikroskopem ve *vodě R.* Přidá se *jod RS1;* droga se nebarví modře.

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 8,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)* za použití *methylcinnamatu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,130 g *methylcinnamatu R* se rozpustí v 50 ml *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 0,500 g práškované drogy (355) se protřepává 1 h s 50 ml *methanolu R* a pak se zfiltruje. Filtr se zbytkem drogy se převede do baňky na 100 ml, přidá se 50 ml *methanolu R*, vaří se 1 h pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí dvakrát 5 ml *methanolu R.* Spojené filtráty a promývací tekutiny se odpaří za sníženého tlaku do sucha, při teplotě nepřesahující 40 °C. Zbytek se smíchá třikrát s 5 ml *methanolu R*, tekutina se zfiltruje do odměrné baňky na 25 ml; filtr se promyje a tekutina se zředí *methanolem R* na 25,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml porovnávacího roztoku ze Zkoušky totožnosti C se zředí *methanolem R* na 2,0 ml.

Chromatografický postup se provádí obvykle za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R*, s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 278 nm,
- injektorové smyčky, 10 μl.

Nastříkne se zkoušený roztok. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku methylcinnamatu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Stanoví se retenční čas harpagosidu za použití 10 μl porovnávacího roztoku za podmínek stejných jako u zkoušeného roztoku.

Obsah harpagosidu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_2 \,.\, F_1 \,.\, 7{,}622}{F_2 \,.\, m_1},$$

v němž značí:
m_1 - navážku drogy v gramech,
m_2 - navážku *methylcinnamatu R* ve 100,0 ml roztoku vnitřního standardu,
F_1 - plochu píku harpagosidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
F_2 - plochu píku methylcinnamatu na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Helianthi oleum

N

Slunečnicový olej

CAS 8001-21-6

Je to čištěný olej získaný lisováním nebo extrakcí částečně loupaných zralých semen druhu *Helianthus annuus* L.

Vlastnosti

Světle žlutá čirá průhledná kapalina. Je velmi těžce rozpustný v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru, mísitelný s etherem petrolejovým.

Tuhne při teplotě asi -16 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se zkouška Totožnost olejů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.2)*. Chromatogram zkoušeného roztoku se shoduje s charakteristickým chromatogramem pro slunečnicový olej.

B. Zkouška Cizí oleje, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,918 až 0,923.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,473 až 1,476.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 125,0 až 136,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 188,0 až 194,0 .

Cizí oleje. Provede se zkouška *(2.4.22)* Cizí oleje v olejích plynovou chromatografií.

Podíl mastných kyselin má toto složení:
- kyselina palmitová: 3,0 % až 10,0 %,
- kyselina stearová: 1,0 % až 10,0 %,
- kyselina olejová (délkou řetezce odpovídá makrogoladipatu 18,3): 62,0 % až 86,0 %,
- kyselina linolová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 18,9): 60,0 % až 75,0 %.

Steroly. Provede se zkouška Steroly v olejích *(2.4.23)*. Podíl sterolů oleje obsahuje:
- kampesterol: 5,0 % až 10,0 %,
- stigmasterol: 5,0 % až 10,0 %,
- β-sitosterol: 55,0 % až 65,0 %.
- delta 5-avenasterol: 2,0 % až 6,0 %,
- delta 7-stigmasterol: 12,0 % až 18,0 %,
- delta 7-avenasterol: 2,0 % až 6,0 %.

Bělené nebo zkažené oleje. 1 ml se ve zkumavce protřepává 1 min s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, pak se smíchá s 1 ml *resorcinolu RS* a protřepává se 5 s. Po 5 min stání není vodná vrstva zbarvena intenzivněji *(2.2.2)* než 1 ml směsi složené z 0,5 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l RS* a 9,5 ml *vody R.*

Uchovávání

Ve zcela naplněných, dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Heparina massae molecularis minoris

Nízkomolekulární hepariny

Jsou to soli sulfatovaných glukosaminoglykanů o průměrné molekulové hmotnosti menší než 8000, z nichž nejméně 60 % látky má molekulovou hmotnost menší než 8000. Jejich různá chemická struktura se projevuje na koncových skupinách polysacharidových řetězců, které jsou povahy redukující nebo neredukující.

Počítáno na vysušenou látku, je v miligramu nejméně 70 m.j. účinnosti protifaktoru Xa. Poměr účinnosti protifaktoru Xa k účinnosti protifaktoru IIa podle postupu popsaného ve zkoušce Stanovení účinnosti činí nejméně 1,5.

Výroba

Při výrobě se používají postupy, které omezují na minimum možnost mikrobiální kontaminace.

Získávají se frakcionací nebo depolymerizací heparinu přirozeného původu, který podle svého složení vyhovuje článku Heparinum natricum nebo Heparinum calcicum pro parenterální použití, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak. Homogenita jednotlivých šarží pro každý typ nízkomolekulárního heparinu je zajištěna důkazem, např. takovým, že průměrná molekulová hmotnost a procentuální podíl látky v definovaném rozmezí molekulové hmotnosti nižší než 8000 jsou v rozmezí 75 % až 125 % průměrné hodnoty, kterou je typ specifikován. Stejné rozmezí platí též pro hodnotu poměru účinnosti protifaktoru Xa k účinnosti protifaktoru IIa.

Nukleotidy a bílkovinné nečistoty v surovině. Před frakcionací se rozpustí 40 mg surového materiálu v 10 ml *vody R*. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 260 nm a 280 nm není větší než 0,20, popř. 0,15.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek, hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (*2.2.33*) s použitím pulzního (Fourierova transformace) spektrometru, který pro ^{13}C měří při 75 MHz.

Zkoušený roztok. 0,200 g se rozpustí ve směsi 0,2 ml *deuteriumoxidu R* a 0,8 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. 0,200 g *nízkomolekulárního heparinu CRL* vhodné specifikace se rozpustí ve směsi 0,2 ml *deuteriumoxidu R* a 0,8 ml *vody R*.

Spektra se zaznamenávají při 40 °C za použití kyvety o průměru 5 mm. Jako vnitřní standard se použije *methanol deuterizovaný R* při δ = 50,0 ppm.

Spektrum zkoušeného roztoku se shoduje se spektrem porovnávacího roztoku obsahujícího *nízkomolekulární heparin CRL* vhodné specifikace.

B. Poměr účinnosti protifaktoru Xa k účinnosti protifaktoru IIa stanovený podle postupu popsaného ve Stanovení účinnosti je nejméně 1,5.

C. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve 2 ml mobilní fáze.
Porovnávací roztok. 20 mg *nízkomolekulárního heparinu pro kalibraci CRL* se rozpustí ve 2 ml mobilní fáze.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,30 m a vnitřního průměru 7,5 mm naplněné porézními křemennými kuličkami (5 μm), která má nejméně 20 000 teoretických pater na metr a schopnost frakcionace bílkovin v rozmezí přibližně 15 000 až 100 000,
- mobilní fáze, kterou je roztok *síranu sodného R* (28,4 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou sírovou zředěnou RS* na 5,0, o průtokové rychlosti 0,5 ml/min,
- detektoru, kterým je diferenční refraktometr.

Kalibrace systému. Nastříkne se 25 μl porovnávacího roztoku. Detekce se provádí diferenčním refraktometrem (RI) spojeným do série s UV spektrofotometrem nastaveným na vlnovou délku 234 nm. UV monitor je připojen k výstupu z kolony a diferenční refraktometr k výstupu z UV monitoru.

Je potřebné změřit přesně časový posun mezi oběma detektory, aby se mohly zaznamenané chromatogramy správně přiřadit. Pro kalibraci se použijí retenční časy získané RI detektorem.

Normalizační faktor, používaný pro výpočet molekulové hmotnosti z poměru RI/UV, se získá takto: vypočítá se celková plocha pod křivkami UV_{234}(ΣUV_{234}) a RI (ΣRI) v požadovaném rozsahu (tj. bez píků soli a rozpouštědla na konci chromatogramu). Vypočítá se poměr *r*:

$$\frac{\Sigma RI}{\Sigma UV_{234}} .$$

Vypočítá se faktor *f*, který násobením hodnotou *r* dává M_{na}(známou průměrnou molekulovou hmotnost kalibrační látky). Hodnota M_{na} kalibrační látky je uvedena v přiloženém certifikátu:

$$\frac{M_{na}}{r} .$$

Jestliže jsou křivky UV_{234} a RI správně přiřazeny, je možno molekulovou hmotnost v kterémkoliv bodě vypočítat podle vztahu:

$$f\frac{RI}{UV_{234}} .$$

Nastříkne se 25 μl zkoušeného roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu, která zaručuje úplnou eluci píků zkoušené látky i rozpouštědla.

Průměrná molekulová hmotnost látky je vyjádřena vztahem:

$$\frac{\Sigma(RI_i M_i)}{\Sigma RI_i} ,$$

v němž značí:

RI_i - množství látky (hmoty) eluované ve frakci *i*,

M_i - molekulovou hmotnost odpovídající frakci *i*.

Hodnota průměrné molekulové hmotnosti látky není větší než 8000 a nejméně 60 % celkové látky má molekulovou hmotnost menší než 8000, kromě toho se parametry molekulové hmotnosti zkoušené látky a odpovídající referenční látky neliší více než o 25 %.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík nebo vápník (*2.3.1*), podle výchozí látky.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 8,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Dusík (*2.5.9*). 1,5 % až 2,5 %, počítáno na vysušenou látku.

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Vápník. Je-li připraven z heparinu, který vyhovuje článku Heparinum calcicum, obsahuje 9,5 % až 11,5 % Ca, počítáno na vysušenou látku. Vápník se stanoví chelatometrickou titrací (*2.5.11*) s 0,200 g zkoušené látky.

Sodík. Je-li připraven z heparinu, který vyhovuje článku Heparinum natricum, obsahuje 9,5 % až 12,5 % Na, počítáno na vysušenou látku. Sodík se stanoví atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, která v mililitru obsahuje 1,27 mg *chloridu cesného R*. Roztok se stejným rozpouštědlem zředí na 100,0 ml.

Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky o koncentraci 25 μg Na/ml, 50 μg Na/ml a 75 μg Na/ml. K jejich přípravě se použije základní *roztok sodíku (200 μg Na/ml)*, který se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* obsahující v mililitru 1,27 mg *chloridu cesného R*.

Měří se absorbance při 330,3 nm za použití sodíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vhodného složení (např. 11 litrů vzduchu a 2 litry acetylenu za minutu).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se 3 h suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřesahujícím 670 Pa.

Molární poměr sulfatových a karboxylatových skupin iontů. Nejméně 1,8. Stanoví se titrací za vodivostní indikace (*2.2.38*). *Vzorek zkoušené látky použitý při této titraci neobsahuje ionizovatelné nečistoty, především soli.*

0,100 g se naváží do malé kuželové baňky, přičemž se dbá na to, aby se předešlo problémům spojeným s hygroskopickými vlastnostmi látky. Přidá se 20 ml *vody R*, dvakrát destilované ve skle a ochladí na 4 °C. 2,0 ml tohoto roztoku se nanesou na předchlazenou kolonu (asi 10 cm x 1 cm) naplněnou vhodným *katexem R*. Kolona se promývá dvakrát ve skle *vodou destilovanou R*, která se zachycuje v titrační nádobě do konečného množství 10 ml až 15 ml. *(Titrační nádoba musí být dostatečně velká, aby se do ní umístily elektrody z konduktometru, míchací tělísko a jemná ohebná trubička z vývodu 2ml byrety*). Míchání je magnetické. Až jsou údaje na konduktometru konstantní, zaznamenají se a začne se titrovat *hydroxidem sodným 0,05 mol/l VS*, který se přidává v 50 μl dávkách. Vždy po přidání se za několik sekund zaznamenají údaje na byretě a na konduktometru. Titruje se do dosažení konečného bodu.

Pro každou naměřenou hodnotu se vypočítá množství miliekvivalentů přidaného hydroxidu sodného z objemu a známé koncentrace roztoku hydroxidu sodného. Do grafu se nanesou hodnoty vodivosti (na osu y) proti hodnotám miliekvivalentů hydroxidu sodného (na ose x). Graf má tři přibližně lineární části: počáteční klesající stupeň křivky, střední mírně vzrůstající a konečný prudce vzrůstající stupeň křivky. Těmito třemi částmi grafu se proloží nejvhodnější přímky. Z bodů, v nichž se protne první přímka s druhou a druhá přímka s třetí, se spustí kolmice k ose x, na níž se odečtou miliekvivalenty hydroxidu sodného spotřebovaného při titraci vzorku v daných bodech. Bod, v němž se protnou první a druhá přímka, udává množství miliekvivalentů hydroxidu sodného spotřebovaného sulfatovými skupinami a bod, v němž se protnou druhá a třetí přímka, udává množství miliekvivalentů spotřebovaných společně sulfatovými i karboxylatovými skupinami. Rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami udává množství miliekvivalentů spotřebovaných karboxylatovými skupinami.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,01 m.j. endotoxinu v mezinárodní jednotce účinnosti protifaktoru Xa. Pro splnění validačních požadavků může být nezbytné přidání dvojmocných kationtů.

Stanovení účinnosti

Antikoagulační účinnost nízkomolekulárního heparinu se určí *in vitro* dvěma metodami, které stanoví jeho schopnost urychlovat inhibici faktoru Xa (anti-Xa zkouška) a trombinu, faktoru IIa (anti-IIa zkouška) antitrombinem III.

Mezinárodními jednotkami jsou účinnosti protifaktoru Xa a protifaktoru IIa obsažené v deklarovaném množství mezinárodního standardu nízkomolekulárního heparinu.

Nízkomolekulární heparin pro stanovení účinnosti BRP je kalibrován v mezinárodních jednotkách na mezinárodní standard dvěma dále uvedenými metodami.

Účinnost protifaktoru Xa

Porovnávací a zkoušené roztoky. Připraví se čtyři nezávislé série se čtyřmi koncentracemi pro každou zkoušenou látku a referenční přípravek nízkomolekulárního heparinu v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,4*. Rozmezí koncentrací je 0,025 m.j. až 0,2 m.j. účinnosti protifaktoru Xa v mililitru. Závislost mezi hodnotami absorbance a logaritmy koncentrací má být lineární.

Postup. Připraví se šestnáct zkumavek, které se vždy po dvou označí písmeny T_1, T_2, T_3 a T_4 pro ředění zkoušené látky a písmeny S_1, S_2, S_3 a S_4 pro ředění referenčního přípravku. Do každé zkumavky se převede 50 µl *antitrombinu III RS1* a 50 µl roztoku příslušného ředění zkoušené látky nebo referenčního přípravku. Pokaždé se roztok promíchá tak, aby nevznikly bubliny. Ve vodní lázni nebo v tepelném bloku se uspořádají zkumavky v pořadí S_1, S_2, S_3, S_4, T_1, T_2, T_3, T_4, T_1, T_2, T_3, T_4, S_1, S_2, S_3, S_4 a ponechají se 1 min při 37 °C. Pak se do každé přidá 100 µl *hovězího faktoru Xa RS*. Přesně za 1 min inkubace se přidá 250 µl *chromoforového substrátu R1*. Reakce se zastaví přesně za 4 min přidáním 375 µl *kyseliny octové R*. Obsah každé zkumavky se přenese do semimikrokyvety a změří se absorbance (*2.2.25*) při 405 nm s použitím vhodného zapisovače. Slepé stanovení amidolytické účinnosti se provede na začátku a na konci měření stejným postupem, pouze místo zkoušeného a porovnávacího roztoku se přidá *tlumivý roztok trometamolový o pH 7,4*. Naměřené hodnoty obou slepých zkoušek se významně neliší. Provede se regresní analýza závislosti absorbance na logaritmech koncentrací zkoušené látky a referenčního přípravku nízkomolekulárního heparinu a vypočítá se účinnost zkoušené látky v mezinárodních jednotkách účinnosti protifaktoru Xa v mililitru pomocí obvyklých statistických metod pro model rovnoběžnosti.

Účinnost protifaktoru IIa

Porovnávací a zkoušené roztoky. Připraví se čtyři nezávislé série se čtyřmi koncentracemi pro každou zkoušenou látku a referenční přípravek nízkomolekulárního heparinu v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,4*. Rozmezí koncentrací je 0,015 m.j. až 0,075 m.j. účinnosti protifaktoru IIa v mililitru. Závislost mezi absorbancí a logaritmy koncentrací má být lineární.

Postup. Připraví se šestnáct zkumavek, které se vždy po dvou označí písmeny T_1, T_2, T_3 a T_4 pro ředění zkoušené látky a písmeny S_1, S_2, S_3 a S_4 pro ředění porovnávacího přípravku. Do každé zkumavky se převede 50 µl *antitrombinu III RS2* a 50 µl roztoku příslušné koncentrace zkoušené látky nebo referenčního přípravku. Pokaždé se roztok promíchá tak, aby nevznikly bubliny. Ve vodní lázni nebo v tepelném bloku se zkumavky uspořádají v pořadí S_1 S_2 S_3 S_4 T_1 T_2 T_3 T_4 T_1 T_2, T_3, T_4, S_1, S_2, S_3, S_4 a ponechají se 1 min při 37 °C. Pak se do každé přidá 100 µl *trombinu lidského RS*. Přesně za 1 min se přidá 250 µl *chromoforového substrátu R2*. Reakce se zastaví přesně za 4 min přidáním 375 µl *kyseliny octové R*. Obsah každé zkumavky se přenese do semimikrokyvety a změří se absorbance (*2.2.25*) při 405 nm s použitím vhodného zapisovače. Slepé stanovení amidolytické účinnosti se provede na začátku a na konci měření stejným způsobem, pouze místo zkoušeného a porovnávacího roztoku se přidá *tlumivý roztok trometamolový o pH 7,4*. Naměřené hodnoty obou slepých zkoušek se významně neliší. Provede se regresní analýza závislosti absorbance na logaritmech koncentrací zkoušené a referenční látky nízkomolekulárního heparinu a vypočítá se účinnost zkoušené látky v mezinárodních jednotkách účinnosti protifaktoru IIa v mililitru pomocí obvyklých statistických metod pro model rovnoběžnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek účinnosti protifaktoru Xa v miligramu,
- počet mezinárodních jednotek účinnosti protifaktoru IIa v miligramu,
- typ nízkomolekulárního heparinu charakterizovaný průměrnou molekulovou hmotností a procenty molekul, které nevybočují z definovaného rozmezí molekulových hmotností,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů,
- zda látka obsahuje sodnou sůl,
- zda látka obsahuje vápenatou sůl.

†† Heparinum calcicum

Vápenatá sůl heparinu

CAS 37270-89-6

Je to vápenatá sůl sulfatovaného glykosaminoglykanu, který je obsažen v tkáních savců. Při úplné hydrolýze se uvolní D-glukosamin, kyselina D-glukuronová, kyselina L-iduronová, kyselina octová a kyselina sírová. Charakteristickou vlastností látky je zpomalení procesu srážení čerstvé krve.

Počítáno na vysušenou látku, je účinnost vápenaté soli heparinu pro parenterální použití nejméně 150 m.j. v miligramu.

Počítáno na vysušenou látku, je účinnost vápenaté soli heparinu, který není určen pro parenterální použití, nejméně 120 m.j. v miligramu.

Výroba

Připravuje se z plic hovězího dobytka nebo ze střevních sliznic hovězího dobytka, prasat nebo ovcí. Při výrobě se používají postupy omezující nebo vylučující mikrobiální kontaminaci a přítomnost látek snižujících krevní tlak.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je mírně hygroskopická, snadno rozpustná ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Zpomaluje srážení čerstvě odebrané krve.

B. 0,40 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Specifická optická otáčivost (*2.2.7*) tohoto roztoku je nejméně +35°.

C. Provede se zónová elektroforéza (*2.2.31*) za použití *agarosy pro elektroforézu R* jako nosiče. K ustálení agarosy a jako roztok elektrolytu se použije směs 50 ml *kyseliny octové ledové R* a 800 ml *vody R* upravená přidáním *hydroxidu lithného R* na pH 3 a zředěná *vodou R* na 1000,0 ml.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. Ve stejném objemu *vody R* se rozpustí *sodná sůl heparinu BRP*.

Na proužek se nanese odděleně po 2 μl až 3 μl každého roztoku. Vyvíjí se 10 min proudem 1 mA až 2 mA na centimetr šířky proužku při napětí 300 V. Proužky se barví roztokem *modři toluidinové R* (1 g/l), jejíž nadbytek se vymyje. Poměr pohyblivostí základní zóny nebo zón na elektroforetogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku je 0,9 až 1,1.

D. Vyhovuje zkoušce na vápník (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Množství zkoušené látky odpovídající 50 000 m.j. se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než stupeň 5 porovnávacího barevného roztoku nejvhodnější barvy (*2.2.2*, *Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 8,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Bílkoviny a nukleotidické nečistoty. 40 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 260 nm není vyšší než 0,20 a absorbance měřená při 280 nm není vyšší než 0,15.

Dusík. Nejvýše 2,5 %, počítáno na vysušenou látku. Dusík se stanoví mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) za použití 0,100 g zkoušené látky.

Vápník. 9,5 % až 11,5 %, počítáno na vysušenou látku. Vápník se stanoví chelatometrickou titrací (*2.5.11*) za použití 0,200 g zkoušené látky.

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 8,0 %. 1,000 g se 3 h suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřekračujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). 32 % až 40 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 0,20 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,01 m.j. endotoxinu v mezinárodní jednotce heparinové účinnosti. Pro splnění validačních požadavků může být nezbytné přidání dvojmocných kationtů.

Stanovení účinnosti

Provede se stanovení heparinu (*2.7.5*). Zjištěná účinnost je v rozmezí 90 % až 111 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti stanovené účinnosti (P = 0,95) je v rozmezí 80 % až 125 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Venenum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodnách jednotek v miligramu,
- název a množství všech přidaných látek,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

†† Heparinum natricum

Sodná sůl heparinu

Synonymum. Heparinum solubile

CAS 9041-08-1

Je to sodná sůl sulfatovaného glykosaminoglykanu, který je obsažen v tkáních savců. Při úplné hydrolýze se uvolní D-glukosamin, kyselina D-glukuronová, kyselina L-iduronová, kyselina octová a kyselina sírová. Charakteristickou vlastností látky je zpomalení srážení čerstvé krve.

Počítáno na vysušenou látku, je účinnost sodné soli heparinu pro parenterální použití nejméně 150 m.j. v miligramu.

Počítáno na vysušenou látku, je účinnost sodné soli heparinu, která není určena pro parenterální použití, nejméně 120 m.j. v miligramu.

Výroba

Připravuje se z plic hovězího dobytka nebo ze střevních sliznic hovězího dobytka, prasat nebo ovcí.

Při výrobě se používají postupy, které omezují nebo vylučují mikrobiální kontaminaci a přítomnost látek snižujících krevní tlak.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je mírně hygroskopická, snadno rozpustná ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Zpomaluje srážení čerstvě odebrané krve.

B. 0,40 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Specifická optická otáčivost (*2.2.7*) tohoto roztoku je nejméně +35°.

C. Provede se zónová elektroforéza (*2.2.31*) za použití *agarosy pro elektroforézu R* jako nosiče. K ustálení agarosy a jako roztok elektrolytu se použije směs 50 ml *kyseliny octové ledové R* a 800 ml *vody R*. pH směsi se upraví přidáním *hydroxidu lithného R* na hodnotu 3 a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. Ve stejném objemu *vody R* se rozpustí *sodná sůl heparinu BRP*.

Na proužek se nanese odděleně po 2 μl až 3 μl každého roztoku. Vyvíjí se 10 min proudem 1 mA až 2 mA na centimetr šířky proužku při napětí 300 V. Barví se roztokem *toluidinové modři R* (1 g/l), jejíž nadbytek se vymyje *vodou R*. Poměr pohyblivostí základní zóny nebo zón na elektroforetogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku je 0,9 až 1,1.

D. Zbytek získaný při stanovení síranového popela, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Množství zkoušené látky odpovídající 50 000 m.j. se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než stupeň 5 porovnávacího barevného roztoku nejvhodnější barvy (*2.2.2,* Metoda II).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 8,0. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,1 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Bílkoviny a nukleotidické nečistoty. 40 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 260 nm není vyšší než 0,20 a absorbance měřená při 280 nm není vyšší než 0,15.

Dusík. Nejvýše 2,5 %, počítáno na vysušenou látku. Dusík se stanoví mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) s 0,100 g zkoušené látky.

Sodík. 9,5 % až 12,5 %, počítáno na vysušenou látku. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*, která v mililitru obsahuje 1,27 mg *chloridu cesného R*, a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky o koncentraci sodíku 25 μg Na/ml, 50 μg Na/ml a 75 μg Na/ml. K jejich přípravě se použije základní *roztok (200 μg Na/ml)*, který se ředí na odpovídající koncentraci *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS*, která obsahuje v mililitru 1,27 mg *chloridu cesného R*.

Změří se absorbance při 330,3 nm za použití sodíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vhodného složení (např. 11 litrů vzduchu a 2 litry acetylenu za minutu).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,5 ml *základního roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 8,0 %. 1,000 g se 3 h suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřekračujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). 30 % až 43 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 0,20 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,01 m.j. endotoxinu v mezinárodní jednotce heparinové účinnosti.

Stanovení účinnosti

Provede se stanovení heparinu (*2.7.5*). Zjištěná účinnost je v rozmezí 90 % až 111 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti stanovené účinnosti (P = 0,95) je v rozmezí 80 % až 125 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Venenum.

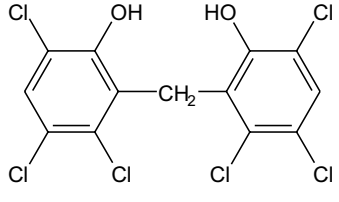
Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodnách jednotek v miligramu,
- název a množství všech přidaných látek,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

Hexachlorophenum

N

Hexachlorofen



$C_{13}H_6Cl_6O_2$ M_r 406,91 CAS 70-30-4

Je to 2,2′-methylenbis(3,4,6-trichlorfenol). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{13}H_6Cl_6O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96 %, velmi snadno rozpustný v acetonu a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 161 °C až 167 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *hexachlorofenu CRL*.

C. 0,1 g zkoušené látky se zahřívá v suché zkumavce. Vznikne bezbarvá tekutina, která se dalším zahříváním postupně barví zeleně, modře až hnědofialově.

D. 5 mg zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *lihu 96 % R* a přidá se 0,05 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Chloridy (*2.4.4*). 0,5 g zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml *lihu 96 % R*, zředí se *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. 5 ml čirého filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na *chloridy* (*500 μg/g*).

Cizí organické látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27)* za použití *silikagelu* $HF_{254}R$

Zkoušený roztok. 0,1 g zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanesou 2 μl zkoušeného roztoku a vyvíjí se *2-butanonem R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a 10 min se suší v sušárně při 105 °C. Po vychladnutí se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není žádná skvrna.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí v 25 ml *lihu 96 % R* předem upraveného na hodnotu pH 9,0 a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do pH 9,0 za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

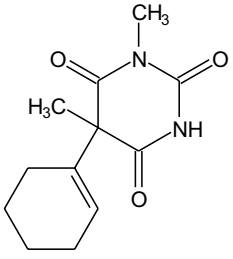
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 40,69 mg $C_{13}H_6Cl_6O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Hexobarbitalum

Hexobarbital



$C_{12}H_{16}N_2O_3$ M_r 236,27 CAS 56-29-1

Je to kyselina (*RS*)-5-(1-cyklohexenyl)-1,5-dimethylbarbiturová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{16}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a v etheru. S alkalickými hydroxidy, alkalickými uhličitany a s amoniakem tvoří ve vodě rozpustné soli.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zasady (1.2).

A. Stanoví se teplota tání *(2.2.14)* zkoušené látky. Potom se smíchají stejné díly zkoušené látky a *hexobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Rozdíl mezi stanovenými teplotami tání (má být asi 146 °C) není větší než 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hexobarbitalu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *hexobarbitalu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se za použití spodní vrstvy směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K asi 10 mg se přidá 1,0 ml roztoku *vanilinu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* a 2 ml ochlazené směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (1 + 2), protřepe se a 5 min se nechá stát; vzniká zelenožluté zbarvení. Potom se směs zahřívá 10 min na vodní lázni; zbarvení se změní na tmavě červené.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 6 ml *vody R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok Ž $_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 1,0 g se přidá 50 ml *vody R*, 2 min se vaří a po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžově žlutý. Ke změně zbarvení na jasně žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF $_{254}$ R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl obou roztoků a vyvíjí se za použití spodní vrstvy směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Po vyjmutí z komory se vrstva ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 5 ml *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*. Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do jasně modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,63 mg $C_{12}H_{16}N_2O_3$.

Uchovávání

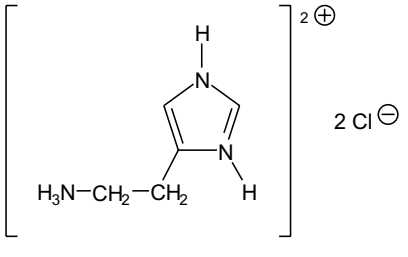
Separandum.

---

†† Histamini dihydrochloridum

Histaminiumdichlorid

Synonymum. Histaminium dichloratum



$C_5H_{11}Cl_2N_3$ M_r 184,07 CAS 56-92-8

Je to 4-(2-aminioethyl)imidazoliumdichlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_{11}Cl_2N_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *histaminiumdichloridu CRL*. Zkouší se tablety připravené za použití 1 mg zkoušené látky a 1 mg referenční látky.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Histidin, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 0,1 g se rozpustí v 7 ml *vody R* a přidají se 3 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l) (roztok 1). 50 mg *kyseliny sulfanilové R* se rozpustí ve směsi 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS* (roztok 2). Roztok 2 se přidá k roztoku 1 a promíchá se; vznikne červené zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,85 až 3,60; měří se roztok S.

Histidin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *histaminiumdichloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *monohydrátu histidiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (a) a 1 ml porovnávacího roztoku (b) se smíchají.

Na vrstvu se odděleně nanese 1 μl zkoušeného roztoku (a), 1 μl zkoušeného roztoku (b), 1 μl porovnávacího roztoku (a), 1 μl porovnávacího roztoku (b) a 2 μl porovnávacího roztoku © a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonitrilu R* (5 + 20 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a vyvíjení se opakuje stejným způsobem. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající histidinu není intenzivnější než

skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany *(2.4.13)*. 3 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,200 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 6 ml *octanu rtuťnatého RS*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,203 mg $C_5H_{11}Cl_2N_3$.

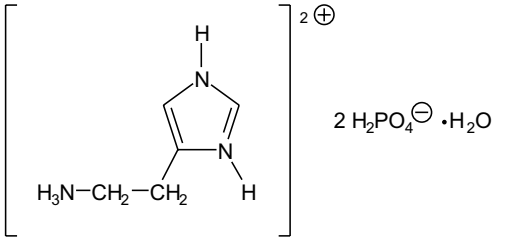
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

---

†† Histamini phosphas

Histaminiumfosfat



$C_5H_{15}N_3O_8P_2 \cdot H_2O$ M_r 325,15 CAS 23297-93-0
M_r bezvodého 307,14

Je to monohydrát 4-(2-aminioethyl)imidazolium-bis(dihydrogenfosfatu). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_{15}N_3O_8P_2$.

Vlastnosti

Bezbarvé dlouhé prismatické krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *histaminiumfosfatu CRL*. Zkouší se tablety připravené za použití 1 mg zkoušené látky a 1 mg referenční látky.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Histidin, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,1 g se rozpustí v 7 ml *vody R* a přidají se 3 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l) (roztok 1). 50 mg *kyseliny sulfanilové R* se rozpustí ve směsi 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS* (roztok 2). Roztok 2 se přidá k roztoku 1 a promíchá se; vznikne červené zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,75 až 3,95; měří se roztok S.

Histidin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *histaminiumfosfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *monohydrátu histidiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (a) a 1 ml porovnávacího roztoku (b) se smíchají.

Na vrstvu se odděleně nanese 1 μl zkoušeného roztoku (a), 1 μl zkoušeného roztoku (b), 1 μl porovnávacího roztoku (a), 1 μl porovnávacího roztoku (b) a 2 μl porovnávacího roztoku (c) a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonitrilu R* (5 + 20 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a vyvíjení se opakuje stejným způsobem. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající histidinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany *(2.4.13)*. 3 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 5,0 % až 6,2 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,140 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

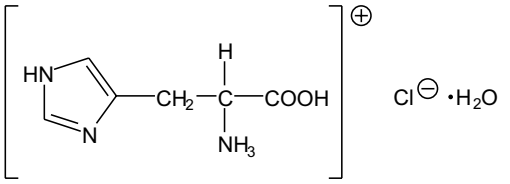
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,36 mg $C_5H_{15}N_3O_8P_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

† Histidini hydrochloridum monohydricum

Monohydrát histidiniumchloridu



$C_6H_{10}ClN_3O_2 . H_2O$ M_r 209,63 CAS 5934-29-2

Je to monohydrát (*S*)-[1-karboxyl-2-(4-imidazolyl)ethyl]amoniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{10}ClN_3O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B, C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Hodnota pH, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *monohydrátu histidiniumchloridu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Asi 0,1 g se rozpustí v 7 ml *vody R* a přidají se 3 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l) (roztok 1). 50 mg *kyseliny sulfanilové R* se rozpustí ve směsi 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS* (roztok 2). Roztok 2 se přidá k roztoku 1 a promíchá se; vzniká oranžově červené zbarvení.

F. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 5,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +9,2° až +10,6°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,75 g ve 12,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *monohydrátu histidiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *monohydrátu histidiniumchloridu CRL* a 10 mg *prolinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, vysuší se v proudu vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 7,0 % až 10 %; suší se 1,000 g v sušárně při 145 °C až 150 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,160 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,16 mg $C_6H_{10}ClN_3O_2$.

Uchovávání

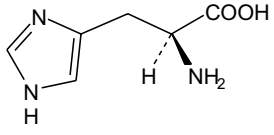
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Histidinum

Histidin

1998



$C_6H_9N_3O_2$ M_r 155,16 CAS 71-00-1

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-(4-imidazolyl)propanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_9N_3O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *histidinu CRL*.

Jestliže se spektrum zkoušené látky liší od spektra referenční látky, rozpustí se odděleně obě látky v co nejmenším množství *vody R*, odpaří se při 60 °C do sucha a se získanými zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 0,1 g se rozpustí v 7 ml *vody R* a přidají se 3 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l) (roztok 1). 50 mg *kyseliny sulfanilové R* se rozpustí ve směsi 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*

a 10 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS* (roztok 2). Roztok 2 se přidá k roztoku 1 a promíchá se; vzniká oranžově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +11,8° až +12,8°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,75 g ve 12,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *histidinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *histidinu CRL* a 10 mg *prolinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, vysuší se v proudu vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a krátce se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívají se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve směsi 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 15 ml *vody R,* je-li třeba mírným zahřátím, a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje

limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,130 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,52 mg $C_6H_9N_3O_2$.

Uchovávání

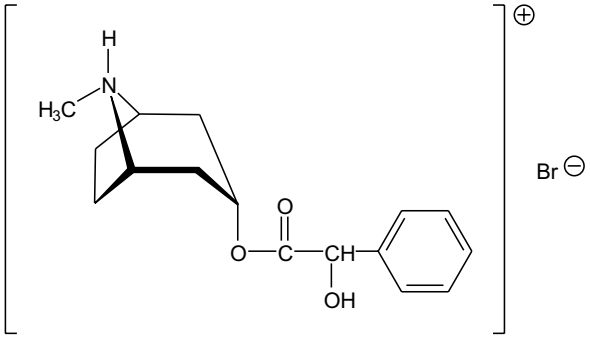
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

†† Homatropini hydrobromidum

Homatropiniumbromid

Synonymum. Homatropinium bromatum



$C_{16}H_{22}BrNO_3$ M_r 356,26 CAS 51-56-9

Je to 3α-(*RS*)-mandeloyloxy-1α*H*,5α*H*-tropaniumbromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{22}BrNO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Taje při asi 215 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *homatropiniumbromidu CRL.*

B. 50 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny octové zředěné RS*, zahřeje se, přidají se 4 ml *trinitrofenolu RS* a ochladí se za občasného zatřepání. Vzniklé krystaly se odfiltrují, promyjí se dvakrát 3 ml ledové *vody R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Krystaly tají *(2.2.14)* při 182 °C až 186 °C.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se mírný nadbytek *amoniaku 17,5% RS* a třepe se s 5 ml *chloroformu R*. Po oddělení se chloroformová vrstva odpaří do sucha na vodní lázni, přidá se 1,5 ml roztoku *chloridu rtuťnatého R* (20 g/l) v *lihu R* 60% *(V/V);* vznikne žluté zbarvení, které zahřátím přechází na červené.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_9 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 6,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) a stejnou směsí se zředí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (16,5 + 16,5 + 67) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C do vymizení pachu rozpouštědel a po ochlazení se stříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* do objevení skvrn. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku 0,5 %.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 7 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

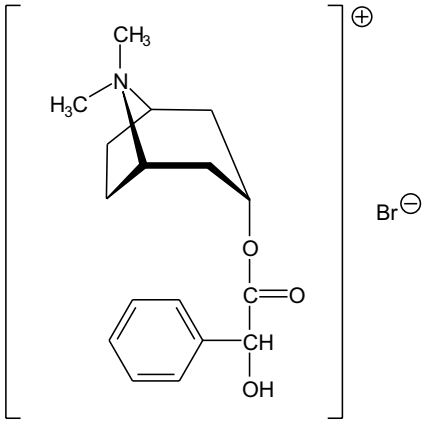
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,63 mg $C_{16}H_{22}BrNO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

†† Homatropini methylbromidum

Homatropiniummethylbromid



$C_{17}H_{24}BrNO_3$ M_r 370,29 CAS 80-49-9

Je to 3α-(*RS*)-mandeloyloxy-N-methyl-1α*H*,5α*H*-tropaniubromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{24}BrNO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 190 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *homatropiniummethylbromidu CRL*.

B. 50 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny octové zředěné RS*, zahřeje se, přidají se 4 ml *trinitrofenolu RS* a ochladí se za občasného zatřepání. Vzniklé krystaly se odfiltrují, promyjí se dvakrát 3 ml ledové *vody R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Krystaly tají *(2.2.14)* při 132 °C až 138 °C.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) a stejnou směsí se zředí na 5 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (16,5 + 16,5 + 67) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C do vymizení pachu rozpouštědel a po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* a potom *peroxidem vodíku zředěným RS.* Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití stříbrné elektrody jako indikační a argentchloridové elektrody jako srovnávací.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,03 mg $C_{17}H_{24}BrNO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

† Hyaluronidasum

Hyaluronidasa

Je to enzym extrahovaný z varlat savců (např. býčích varlat), který hydrolyzuje mukopolysacharidy typu kyseliny hyaluronové. Počítáno na vysušenou látku, účinnost hyaluronidasy je nejméně 300 m.j. v miligramu. Může obsahovat vhodný stabilizátor.

Výroba

Zvířata, ze kterých je hyaluronidasa získávána, musí splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro humánní konzumaci. Pokud se pro výrobu použije tkáň bovinního původu, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí tkáně, jež se má použít, se má vzít v úvahu relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské Unie "Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosu původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků" (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Hyaluronidasa se vyrábí validovanými metodami extrakce a purifikace v podmínkách zajišťujících minimalizování stupně mikrobální kontaminace; výrobní metody musí prokazatelně redukovat jakoukoliv kontaminaci viry nebo jinými známými původci infekce na přijatelné limity.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý amorfní prášek. Je dobře rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v acetonu, v ethanolu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Roztok obsahující 100 m.j. hyaluronidasy v 1 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) depolymerizuje za 1 min stejný objem roztoku *hyaluronatu sodného BRP* (10 g/l) při 20 °C, což se projeví výrazným poklesem viskozity. Toto působení se zastaví zahříváním hyaluronidasy 30 min při 100 °C.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml; roztok je čirý *(2.2.1)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 7,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 30 mg v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se 2 h suší při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 0,2 m.j. endotoxinu v mezinárodní jednotce hyaluronidasové účinnosti.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušené látky se stanoví porovnáním rychlosti, kterou hydrolyzuje *hyaluronat sodný BRP*, s rychlostí zjištěnou při použití mezinárodního standardu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách za použití modelu poměru sklonů.

Roztok substrátu. K 0,1 g *hyaluronatu sodného BRP* se v 25ml kuželové baňce pomalu přidá 20,0 ml *vody R* při 4 °C. Rychlost přidávání musí být dostatečně pomalá, aby částice substrátu mohly nabobtnat (asi 5 min). Směs se udržuje při 4 °C a míchá se nejméně 12 h. Uchovává se při 4 °C a použije se během 4 dnů.

Zkoušený roztok. Vhodné množství zkoušené látky se rozpustí v *rozpouštědle pro hyaluronidasu R* tak, aby výsledný roztok obsahoval v 1 ml (0,6 ± 0,3) m.j. hyaluronidasy.

Porovnávací roztok. Vhodné množství *hyaluronidasy BRP* se rozpustí v *rozpouštědle pro hyaluronidasu R* tak, aby výsledný roztok obsahoval v 1 ml 0,6 m.j. hyaluronidasy.

V reakční nádobě se smíchá 1,50 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,4* a 1,0 ml roztoku substrátu a udržuje se při (37 ± 0,1) °C. V čase $t_1 = 0$ (první časoměřič) se přidá 0,5 ml zkoušeného roztoku obsahujícího E_t mg zkoušeného enzymu, zamíchá se, pomocí vhodného viskozimetru se změří viskozita roztoku při (37 ± 0,1) °C a během 20 min se zaznamená několikrát průtokový čas za použití druhého časoměřiče (děleného po 0,1 s) (odečte se první časoměřič). Vhodným viskozimetrem je Ubbelohdeho mikroviskozimetr (DIN 51 562, část 2) kapilární typ M II s konstantou viskozimetru asi 0,1 mm^2/s^2.

Postup se opakuje s 0,50 ml porovnávacího roztoku obsahujícího E_r mg *hyaluronidasy BRP*.

Poměr viskozit se vypočítá ze vzorce:

$$\eta_r = \frac{k \cdot t_2}{0{,}6915} ,$$

v němž značí:

k - konstantu viskozimetru v mm^2/s^2 uvedenou na viskozimetru,

t_2 - průtokový čas roztoku v sekundách,

0,6915 - kinematickou viskozitu v mm^2/s tlumivého roztoku při 37 °C.

Protože enzymatická reakce pokračuje během měření průtokových časů, skutečný čas reakce se rovná $t_1 + t_2/2$, přičte se polovina průtokového času ($t_2/2$) zjištěného při daném měření k času t_1, při kterém měření začalo. Vynese se $(\ln \eta_r)^{-1}$ jako funkce reakčního času ($t_1 + t_2/2$) v sekundách. Získá se lineární poměr. Vypočítá se sklon pro zkoušenou látku (b_t) a pro referenční látku (b_r).

Vypočítá se specifická účinnost v m.j./mg ze vzorce:

$$\frac{b_t}{b_r} \cdot \frac{E_r}{E_t} \cdot A ,$$

v němž značí:

A - specifickou účinnost *hyaluronidasy BRP* v m.j./mg.

Celý postup se provede nejméně třikrát a vypočte se průměrná účinnost zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech při teplotě 2 °C až 8 °C. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních zabezpečených obalech.

Separandum.

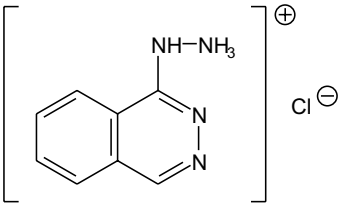
Označování

V označení na obalu se uvede:

- účinnost v mezinárodních jednotkách na miligram,
- zda je látka sterilní.

† Hydralazini hydrochloridum

Hydralaziniumchlorid



$C_8H_9ClN_4$ M_r 196,64 CAS 304-20-1

Je to 1-ftalazinylhydraziniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % $C_8H_9ClN_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu.

Taje při asi 275 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje čtyři absorpční maxima: při 240 nm, 260 nm, 303 nm a 315 nm. Poměr absorbance zjištěné v maximu při 240 nm k absorbanci zjištěné v maximu při 303 nm je 2,0 až 2,2.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *hydralaziniumchloridu CRL*.

C. 0,5 g se rozpustí ve směsi 8 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 100 ml *vody R,* přidají se 2 ml *dusitanu sodného RS*, nechá se 10 min stát a zfiltruje se. Sraženina promytá *vodou R* a vysušená při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 209 °C až 212 °C.

D. 10 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Přidají se 2 ml roztoku *nitrobenzaldehydu R* (20 g/l) v *lihu 96% R;* vznikne oranžová sraženina.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 4,2; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 25,0 mg *ftalazinu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 4,0 ml zkoušeného roztoku a 10,0 ml porovnávacího roztoku (c) se smíchají a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem nitrilovaným pro chromatografii R1* (10 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml/min, kterou je směs připravená takto: k 22 objemovým dílům *acetonitrilu R* se přidá 78 objemových dílů roztoku obsahujícího 1,44 g *laurylsíranu sodného R* a 0,75 g *tetrabutylamoniumbromidu R* v litru, jehož pH byl upraveno *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* na hodnotu 3,0,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 70 % celé stupnice zapisovače. Je-li chromatogram zaznamenán za předepsaných podmínek, retenční čas hydralazinu je asi 10 min až 12 min. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dva hlavní píky, rozlišení mezi těmito píky je nejméně 2,5 a poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) k šumu je nejméně 3.

Hydralazin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,12 g se rozpustí ve 4 ml *vody R* a přidají se 4 ml roztoku *salicylaldehydu R* (150 g/l) v *methanolu R* a 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové R.* Promíchá se a nechá stát při teplotě nepřesahující 25 °C po dobu 2 h až 4 h, dokud vzniklá sraženina nevytvoří sediment. Přidají se 4 ml *toluenu R*, silně se protřepe a odstřeďuje se. Čirá supernatantní tekutina se převede do 100ml dělicí nálevky, oddělí se toluenová vrstva a silně se třepe dvakrát po 3 min vždy s 20 ml roztoku *disiřičitanu sodného R* (200 g/l) a dvakrát s 50 ml *vody R.* Oddělí se toluenová vrstva, která je zkoušený roztok.

Porovnávací roztok (a). 12 mg *hydraziniumsulfatu R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). Připraví se současně stejným způsobem, jak je popsáno pro zkoušený roztok za použití 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) a 3 ml *vody R.*

Na vrstvu se odděleně nanese 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Žádná skvrna vykazující žlutou fluorescenci na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (10 μg/g hydralazinu).

Těžké kovy *(2.4.8).* 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí ve 25 ml *vody R.* Přidá se 35 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití kalomelové srovnávací elektrody a platinové indikační elektrody.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 9,832 mg $C_8H_9ClN_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

†† Hydrargyri dichloridum

Chlorid rtuťnatý

Synonymum. Hydrargyrum dichloratum

$HgCl_2$ M_r 271,50 CAS 7487-94-7

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,5 % až 100,5 % sloučeniny $HgCl_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé, popř. bílé krystaly a nebo těžká krystalická hmota. Je dobře rozpustný ve vodě, v etheru a glycerolu, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na chloridy *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce na rtuť *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok je červený. Přidá se 0,5 g *chloridu sodného R;* zbarvení roztoku se změní na žluté. Na změnu zbarvení roztoku na červené se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Chlorid rtuťný. 1,0 g se rozpustí ve 30 ml *etheru R;* roztok neopalizuje.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; suší se 2,000 g ve vakuu po dobu 24 h.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidá se 20,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS*, 5 ml *tlumivého roztoku o pH 10,9* a nechá se 15 min stát. Přidá se 0,1 g *černi eriochromové T R* a titruje se *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* do vzniku purpurového zbarvení. Přidají se 3 g *jodidu draselného R*, 2 min se směs nechá stát a potom se znovu přidá 0,1 g *černi eriochromové T R* a znovu se titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS.*

1 ml *síranu zinečnatého 0,1 mol/l VS* spotřebovaného na druhou titraci odpovídá 27,15 mg $HgCl_2$.

Uchovávání

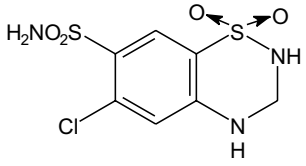
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

† Hydrochlorothiazidum

1998

Hydrochlorothiazid



$C_7H_8ClN_3O_4S_2$ M_r 297,73 CAS 58-93-5

Je to 3,4-dihydro-6-chlor-7-sulfamoyl-2*H*-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_7H_8ClN_3O_4S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml a měří se absorbance roztoku při 250 nm až 350 nm *(2.2.25);* roztok vykazuje absorpční maximum při 273 nm a při 323 nm. Poměr absorbance naměřené při 273 nm k absorbanci naměřené při 323 nm je 5,4 až 5,7.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hydrochlorothiazidu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *hydrochlorothiazidu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *chlorothiazidu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se *ethylacetatem R* po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. 1 mg se opatrně zahřívá s 2 ml čerstvě připraveného roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (0,5 g/l) v ochlazené směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (35 + 65); vzniká fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,5 g upráškované zkoušené látky se 2 min třepe s 25 ml *vody R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* a 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je žlutý. Do vzniku červeného zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Tlumivý roztok fosforečnanový zředěný o pH 3,2. Do 2000ml odměrné baňky se odměří 100,0 ml *hydrogenfosforečnanu sodného R 0,1 mol/l RS*. pH roztoku se upraví *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu 3,2, doplní se *vodou R* po značku a promíchá se.
Rozpouštěcí roztok. 50,0 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým zředěným o pH 3,2* na 200,0 ml.
Zkoušený roztok. 30,0 mg se rozpustí v 5 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R,* je-li třeba za použití ultrazvuku, a zředí se *tlumivým roztokem fosforečnanovým zředěným o pH 3,2* na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15,0 mg *hydrochlorothiazidu CRL* a 15,0 mg *chlorothiazidu CRL* se rozpustí ve 25 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R,* je-li třeba za použití ultrazvuku, a zředí se *tlumivým roztokem fosforečnanovým zředěným o pH 3,2* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí rozpouštěcím roztokem na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí rozpouštěcím roztokem na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí rozpouštěcím roztokem na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min a s následujícími podmínkami lineárního gradientového programu:
  - *mobilní fáze A* - k 940 ml *tlumivého fosforečnanového roztoku zředěného o pH 3,2* se přidá 60,0 ml *methanolu R* a 10,0 ml *tetrahydrofuranu R* a promíchá se.
  - *mobilní fáze B* - ke směsi 500 ml *methanolu R* a 500 ml *tlumivého fosforečnanového roztoku zředěného o pH 3,2* se přidá 50,0 ml *tetrahydrofuranu R* a promíchá se,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 - 17	100 → 55	0 → 45	lineární gradient
17 - 30	55	45	izokratická eluce
30 - 35	55 → 100	45 → 0	lineární gradiet
35 - 50	100	0	izokratická eluce
50 = 0	100	0	vrácení na počáteční složení

- spektrofotometrického detektoru, 224 nm.

Kolona se nejméně 20 min ustaluje promýváním mobilní fází A. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu získaném s 10 μl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: chlorothiazidu asi 7 min a hydrochlorothiazidu asi 8 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže je rozlišení mezi píkem odpovídajícím chlorothiazidu a píkem odpovídajícím hydrochlorothiazidu nejméně 2,5. Je-li třeba, upraví se složení mobilní fáze nebo se upraví časový program lineární gradientové eluce.

Nastříkne se odděleně 10 μl rozpouštěcího roztoku jako slepá zkouška, 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %). Nepřihlíží se k píkům získaným s rozpouštěcím roztokem a k píkům s plochou menší než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Chloridy *(2.4.4)*. 1,0 g se rozpustí ve 25 ml *acetonu R* a zředí se *vodou R* na 30 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 10 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)* a 5 ml *acetonu R* obsahujícího 15 % *(V/V) vody R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,120 g se rozpustí v 50 ml *dimethylsulfoxidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* do druhého inflexního bodu.

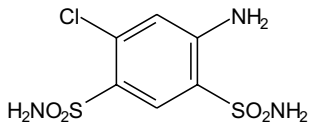
1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,88 mg $C_7H_8ClN_3O_4S_2$.

Uchovávání

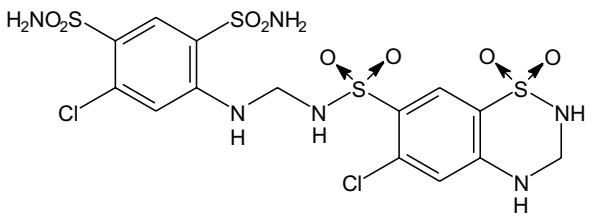
Separandum.

Nečistoty

A. chlorothiazid,



B. 4-amino-6-chlor-1,3-benzendisulfonamid,

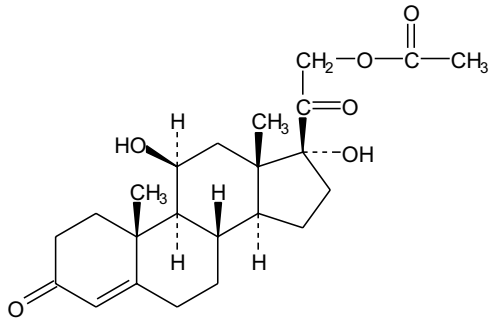


C. 3,4-dihydro-6-chlor-7-{{[[(-3-chlor-4,6-disulfamoylfenyl)amino]methyl]amino}sulfmoyl}-2*H*--1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid.

† Hydrocortisoni acetas

Hydrokortisonacetat

Synonymum. Hydrocortisonum aceticum



$C_{23}H_{32}O_6$ M_r 404,50 CAS 50-03-3

Je to 11β,17,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion-21-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{23}H_{32}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v dichlormethanu.

Taje při asi 220 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hydrokortisonacetatu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *hydrokortisonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kortisonacetatu R* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje v denním světle polohou, zbarvením a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě zkoušeného roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS,* ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se po dobu 5 min. Pak se zkumavka uzavře, zahřívá se ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem po dobu 2 h 30 min a potom se nechá ochladit.

Porovnávací roztok (a). 25 mg *hydrokortisonacetatu CRL* se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě porovnávacího roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou, přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného v methanolu RS,* ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se po dobu 5 min. Pak se zkumavka uzavře, zahřívá se ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem po dobu 2 h 30 min a potom se nechá ochladit.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se shoduje polohou, zbarvením v denním světle a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; do 5 min vznikne hnědočervené zbarvení se zelenou fluorescencí, která je intenzivní v ultrafialovém světle při 365 nm. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení mizí, fluorescence v ultrafialovém světle zůstává.

E. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +158° až +167°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *hydrokortisonacetatu CRL* a 2 mg *kortisonacetatu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml/min, kterou je směs připravená takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 400 ml *acetonitrilu R* s 550 ml *vody R* a nechá se ustálit. Směs se doplní na 1000 ml *vodou R* a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se ustálí promýváním mobilní fází po dobu 30 min při průtokové rychlosti 1 ml/min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Je-li chromatogram zaznamenán za předepsaných podmínek, retenční časy jsou: hydrokortisonacetatu asi 10 min a kortisonacetatu asi 12 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky hydrokortisonacetatu a kortisonacetatu není menší než 4,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); plocha nejvýše jednoho takového píku je větší než polovina plochy hlavního píku na na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241,5 nm.

Obsah $C_{23}H_{32}O_6$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 395.

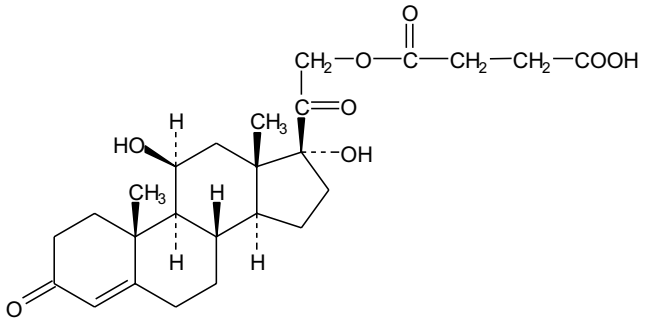
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Hydrocortisoni hemisuccinas

Hydrokortisonhydrogensukcinat

Synonyma. Hydrocortisoni hydrogenosuccinas, Hydrocortisonum hydrogensuccinicum



$C_{25}H_{34}O_8$ M_r 462,54 CAS 2203-97-6

Je to 11β,17α,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion-21-hydrogenbutandioat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{25}H_{34}O_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v ethanolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických uhličitanů a alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hydrokortisonhydrogensukcinatu CRL*. Zkouší se látky sušené 3 h při 100 °C až 105 °C.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *hydrokortisonhydrogensukcinatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *methylprednisolonhydrogensukcinatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *ethanolu R* a *dichlormethanu R* (0,1 + 1 + 15) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká

kyselinou sírovou v lihu RS a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, zbarvením v denním světle a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě skvrny, které nemusí být úplně oddělené.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě zkoušeného roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou, přidá se 10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (0,8 g/l) v *methanolu R*, ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se po dobu 5 min. Pak se zkumavka uzavře, zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem a potom se nechá ochladit.

Porovnávací roztok (a). 25 mg *hydrokortisonhydrogensukcinatu CRL* se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě porovnávacího roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se přenesou do 15ml skleněné zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou, přidá se 10 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (0,8 g/l) v *methanolu RS*, ihned se do roztoku zavede proud *dusíku R* a probublává se po dobu 5 min. Pak se zkumavka uzavře, zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 45 °C chráněna před světlem a potom se nechá ochladit.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se shoduje polohou, zbarvením v denním světle a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; do 5 min vznikne intenzivní hnědočervené zbarvení se zelenou fluorescencí, která je intenzivní v ultrafialovém světle při 365 nm. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok. Fluorescence v ultrafialovém světle zůstává.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,10 g se rozpustí v 5 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS*. Roztok je čirý *(2.2.1)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +147° až +153°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 2 mg *hydrokortisonhydrogensukcinatu CRL* a 2 mg *dexamethasonu CRL* se rozpustí v 50 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml/min, kterou je směs připravená takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 330 ml *acetonitrilu R* s 600 ml *vody R* a 1,0 ml *kyseliny fosforečné R* a nechá se ustálit. Směs se doplní na 1000 ml *vodou R* a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se ustálí promýváním mobilní fází po dobu 30 min při průtokové rychlosti 1 ml/min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Je-li chromatogram zaznamenán za popsaných podmínek, retenční časy jsou: dexamethasonu asi 12,5 min, hydrokortisonhydrogensukcinatu asi 15 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím dexamethasonu a píkem odpovídajícím hydrokortisonhydrogensukcinatu je nejméně 5,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 0,75násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,75 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 4,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241,5 nm.

Obsah $C_{25}H_{34}O_8$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 353.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

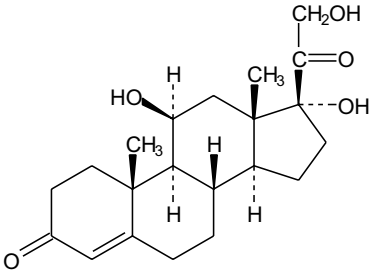
Separandum.

Nečistoty

A. hydrokortison,
B. hydrokortisonacetat.

† Hydrocortisonum

Hydrokortison



$C_{21}H_{30}O_5$ M_r 362,46 CAS 50-23-7

Je to 11β,17,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{21}H_{30}O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu a v lihu 96%, těžce rozpustný v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v etheru.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hydrokortisonu CRL*. Jestliže spektrum zkoušené látky a spektrum referenční látky v tuhém stavu vykazují rozdíly, rozpustí se obě látky odděleně v co nejmenším množství *acetonu R,* odpaří se do sucha na vodní lázni a se zbytky se znovu zaznamenají spektra látek.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *hydrokortisonu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *prednisolonu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Potom se vrstva podruhé vyvíjí směsí objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R, toluenu R* a *etheru R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm.

Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, zbarvením v denním světle a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě zkoušeného roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se přenesou do skleněné zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm opatřené skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se odpaří za mírného zahřátí a pod proudem *dusíku R.* Přidají se 2 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 15% *(V/V)* a 50 mg *bismutičnanu sodného R.* Zkumavka se uzavře a 1 h se třepe na mechanické třepačce za chánění před světlem. Přidají se 2 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 15% *(V/V),* směs se zfiltruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R.* Čirý filtrát se protřepe s 10 ml *dichlormethanu R,* organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS,* dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se *síranem sodným bezvodým R.*

Porovnávací roztok (a). 25 mg *hydrokortisonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml (tento roztok se použije také k přípravě porovnávacího roztoku (b)). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se přenesou do skleněné zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm opatřené skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se odpaří za mírného zahřátí a pod proudem *dusíku R.* Přidají se 2 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 15% *(V/V)* a 50 mg *bismutičnanu sodného R.* Zkumavka se uzavře a 1 h se třepe na mechanické třepačce za chánění před světlem. Přidají se 2 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 15% *(V/V),* směs se zfiltruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R.* Čirý filtrát se protřepe s 10 ml *dichlormethanu R,* organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS,* dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se *síranem sodným bezvodým R.*

Na vrstvu se odděleně nanese 5 μl zkoušeného roztoku (a), 5 μl porovnávacího roztoku (a), 25 μl zkoušeného roztoku (b) a 25 μl porovnávacího roztoku (b); poslední dva roztoky se nanášejí po malých množstvích do malých skvrn. Vyvíjí se směsí připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) do směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Potom se vrstva podruhé vyvíjí směsí objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušených roztoků se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogra-

mech zkoušených roztoků se v denním světle shoduje polohou, zbarvením a fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně vyšší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 2 mg se přidají ke 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; do 5 min vznikne intenzivní hnědočervené zbarvení se zelenou fluorescencí, která je intenzivní v ultrafialovém světle při 365 nm. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a zůstane čirý roztok. Fluorescence v ultrafialovém světle zůstává.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +150° až +156°; počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *hydrokortisonu CRL* a 2 mg *prednisolonu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze při průtokové rychlosti 1 ml/min, kterou je směs připravená takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 3,5 ml *vody R,* 50 ml *methanolu R* a 700 ml *chloroformu stabilizovaného amylenem R* a nechá se ustálit. Směs se doplní na 1000,0 ml *chloroformem stabilizovaným amylenem R* a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se ustálí promýváním mobilní fází po dobu 45 min při průtokové rychlosti 1 ml/min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Je-li chromatogram zaznamenán za předepsaných podmínek, retenční časy jsou: hydrokortisonu asi 12 min a prednisolonu asi 15 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky hydrokortisonu a prednisolonu není menší než 5,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace *methanolu R* a *vody R* v mobilní fázi, při zachování jejich poměru koncentrací a homogenity mobilní fáze.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241,5 nm.

Obsah $C_{21}H_{30}O_5$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 448.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. prednisolon.

Hydrogenii peroxidum 30%

Peroxid vodíku 30%

Synonyma. Solutio hydrogenii peroxydati concentrata, Hydrogenium peroxydatum concentratum, koncentrovaný roztok peroxidu vodíku

H_2O_2 M_r 34,01 CAS 7722-84-1

Je to roztok peroxidu vodíku, který obsahuje 29,0 % až 31,0 % sloučeniny H_2O_2. Jeden objemový díl tohoto roztoku odpovídá asi 110 objemovým dílům kyslíku. Roztok může obsahovat vhodný stabilizátor.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l RS;* roztok se odbarvuje za současného vývoje plynu.

B. K 0,05 ml se přidají 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 2 ml *etheru R* a 0,05 ml *chromanu draselného RS* a protřepe se; etherová vrstva se zbarví modře.

C. Rozmezí stanovení obsahu H_2O_2 je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. K 10 ml se přidá 100 ml *vody R* a 0,25 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejméně 0,05 ml a nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Organické stabilizátory. 20 ml se protřepe jedenkrát s 10 ml a dvakrát s 5 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové výtřepky se odpaří za sníženého tlaku při teplotě nepřevyšující 25 °C. Zbytek po odpaření se vysuší v exsikátoru; zůstatek váží nejvýše 10 mg (500 μg/ml).

Netěkavé látky. 10 ml se nechá stát, je-li třeba za chlazení, v platinové misce tak dlouho, až ustane vývoj plynu. Potom se roztok odpaří na vodní lázni do sucha a suší se při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 20 mg (2 g/l).

Stanovení obsahu

1,00 g se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 20 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a titruje se *manganistanem draselným 0,02 mol/l VS* do růžového zbarvení.

1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* odpovídá 1,701 mg H_2O_2 nebo 0,56 ml kyslíku.

Uchovávání

Chráněn před světlem. Pokud roztok neobsahuje stabilizační přísady, uchovává se při teplotě nepřesahující 15 °C.

Označování

Obsahuje-li roztok stabilizační přísadu, v označení na obalu se uvede název stabilizační přísady.

Upozornění

Při styku s oxidovatelnými organickými látkami, některými kovy a v alkalickém prostředí se prudce rozkládá.

Hydrogenii peroxidum 3%

Peroxid vodíku 3%

Synonyma. Solutio hydrogenii peroxydati diluta, Hydrogenium peroxydatum solutum, zředěný roztok peroxidu vodíku

Je to roztok peroxidu vodíku, který obsahuje 2,5 % až 3,5 % sloučeniny H_2O_2 (M_r 34,01). Jeden objemový díl tohoto roztoku odpovídá asi 10 objemovým dílům kyslíku. Roztok může obsahovat vhodný stabilizátor.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina.

Zkoušky totožnosti

A. K 2 ml se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l RS;* po několika sekundách se roztok odbarví nebo je slabě růžový za současného vývoje plynu.

B. K 0,5 ml se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 2 ml *etheru R* a 0,1 ml *chromanu draselného RS* a protřepe se; etherová vrstva se zbarví modře.

C. Rozmezí stanovení obsahu H_2O_2 je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. K 10 ml se přidá 20 ml *vody R* a 0,25 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejméně 0,05 ml a nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Organické stabilizátory. 20 ml se protřepe jedenkrát s 10 ml a dvakrát s 5 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové výtřepky se odpaří za sníženého tlaku při teplotě nepřevyšující 25 °C. Zbytek po odpaření se vysuší v exsikátoru; zůstatek váží nejvýše 5 mg (250 μg/ml).

Netěkavé látky. 10 ml se nechá stát v platinové misce tak dlouho, až ustane vývoj plynu. Potom se roztok odpaří na vodní lázni do sucha a suší se při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 20 mg (2 g/l).

Stanovení obsahu

10,0 g se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 20 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a titruje se *manganistanem draselným 0,02 mol/l VS* do růžového zbarvení.

1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* odpovídá 1,701 mg H_2O_2 nebo 0,56 ml kyslíku.

Uchovávání

Chráněn před světlem. Pokud roztok neobsahuje stabilizační přísady, uchovává se při teplotě nepřesahující 15 °C.

Označování

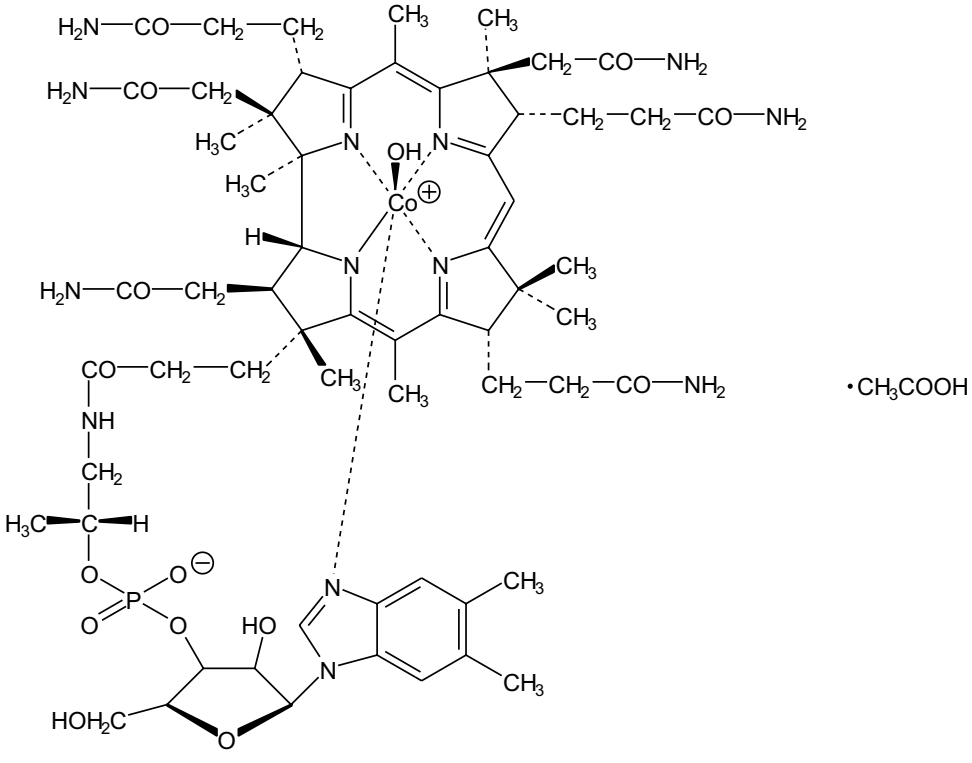
Obsahuje-li roztok stabilizační přísadu, uvede se v označení na obalu název stabilizační přísady.

Upozornění

Při styku s oxidovatelnými organickými látkami, některými kovy a v alkalickém prostředí se prudce rozkládá.

† Hydroxocobalamini acetas

Hydroxokobalaminacetat



$C_{64}H_{93}CoN_{13}O_{17}P$ M_r 1406,42 CAS 13422-51-0

Je to Coα-[α-(5,6-dimethylbenzimidazolyl)]-Coβ-hydroxokobamidacetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{64}H_{93}CoN_{13}O_{17}P$.

Vlastnosti

Tmavě červený krystalický prášek nebo tmavě červené krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi hygroskopický. Při sušení se může rozkládat.

Zkoušky totožnosti

A. 2,5 mg se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,8 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 10,9 g/l *octanu sodného R* a zředí se stejným roztokem na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 260 nm až 610 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 274 nm, při 351 nm a při 525 nm. Poměr absorbance v maximu při 274 nm k absorbanci v maximu při 351 nm je 0,75 až 0,83. Poměr absorbance v maximu při 525 nm k absorbanci v maximu při 351 nm je 0,31 až 0,35.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkouška se provede za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok. 2 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R.*
Porovnávací roztok. 2 mg *hydroxokobalaminu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R.*

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *methanolu R* (25 + 75) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na octany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*. *Použijí se čerstvě připravné roztoky za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 10 ml *vody R*. Po ochlazení se přidá 1 ml roztoku *chloraminu T R* (20 g/l) a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,05 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Pak se roztok protřepe a 5 min se nechá stát. Nastřikuje se ihned po přípravě.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku obsahujícího *kyselinu citronovou R* (15 g/l) a *hydrogenfosforečnan sodný R* (8,1 g/l) (19,5 + 80,5); průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 351 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající 4násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou tři hlavní píky a rozlišení mezi páry sousedících píků není menší než 3,0 a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je jeden hlavní pík s poměrem signálu k šumu nejméně 5.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 8,0 % až 12,0 %; 0,400 g se suší při teplotě 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

Během stanovení se roztoky chrání před světlem.

25,0 mg se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,8 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 10,9 g/l *octanu sodného R* a zředí se stejným roztokem na 1000,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 351 nm.

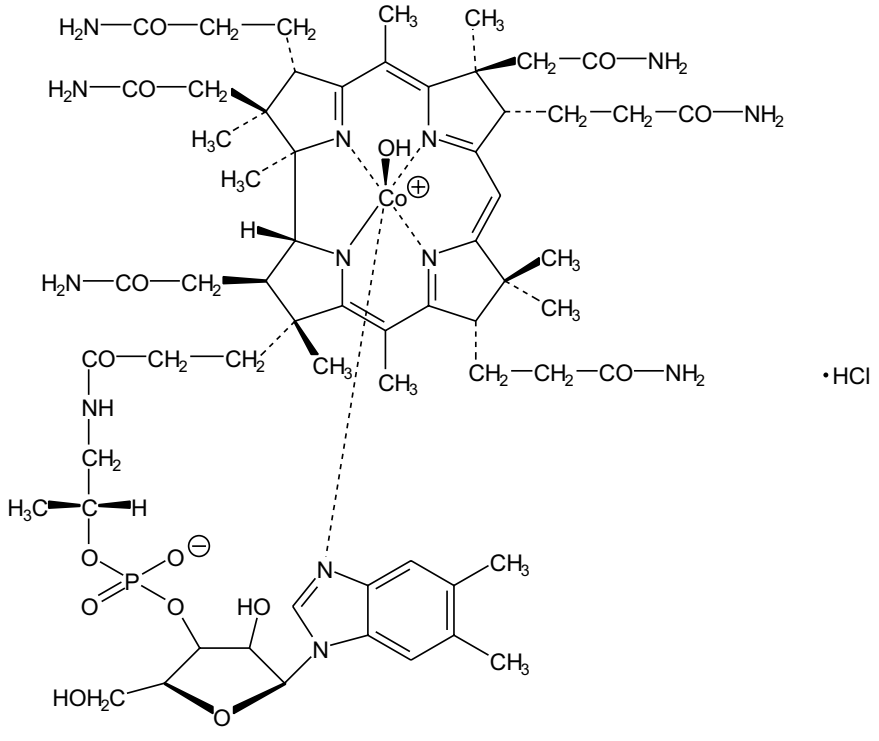
Vypočítá se obsah sloučeniny $C_{64}H_{93}CoN_{13}O_{17}P$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 187.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.
Separandum.

† Hydroxocobalamini chloridum

Hydroxokobalaminchlorid



$C_{62}H_{90}ClCoN_{13}O_{15}P$ M_r 1382,83 CAS 78091-12-0

Je to Coα-[α-(5,6-dimethylbenzimidazolyl)]-Coβ-hydroxokobamidchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{62}H_{90}ClCoN_{13}O_{15}P$.

Vlastnosti

Tmavě červený krystalický prášek nebo tmavě červené krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi hygroskopický. Při sušení se může rozkládat.

Zkoušky totožnosti

A. 2,5 mg se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,8 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 10,9 g/l *octanu sodného R* a zředí se stejným roztokem na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 260 nm až 610 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 274 nm, při 351 nm a při

525 nm. Poměr absorbance v maximu při 274 nm k absorbanci v maximu při 351 nm je 0,75 až 0,83. Poměr absorbance v maximu při 525 nm k absorbanci v maximu při 351 nm je 0,31 až 0,35.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkouška se provede za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok. 2 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R*. *Porovnávací roztok*. 2 mg *hydroxokobalaminu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *methanolu R* (25 + 75) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*. *Použijí se čerstvě připravné roztoky za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 10 ml *vody R*. Po ochlazení se přidá 1 ml roztoku *chloraminu T R* (20 g/l) a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,05 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Pak se roztok protřepe a 5 min se nechá stát. Nastřikuje se ihned po přípravě.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku obsahujícího *kyselinu citronovou R* (15 g/l) a *hydrogenfosforečnan sodný R* (8,1 g/l) (19,5 + 80,5); průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 351 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající 4násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou tři hlavní píky a rozlišení mezi páry sousedících píků není menší než 3,0 a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je jeden hlavní pík s poměrem signálu k šumu nejméně 5.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 8,0 % až 12,0 %; 0,400 g se suší při teplotě 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

Během stanovení se roztoky chrání před světlem.

25,0 mg se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,8 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 10,9 g/l *octanu sodného R* a zředí se stejným roztokem na 1000,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 351 nm.

Vypočítá se obsah sloučeniny $C_{62}H_{90}ClCoN_{13}O_{15}P$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 190.

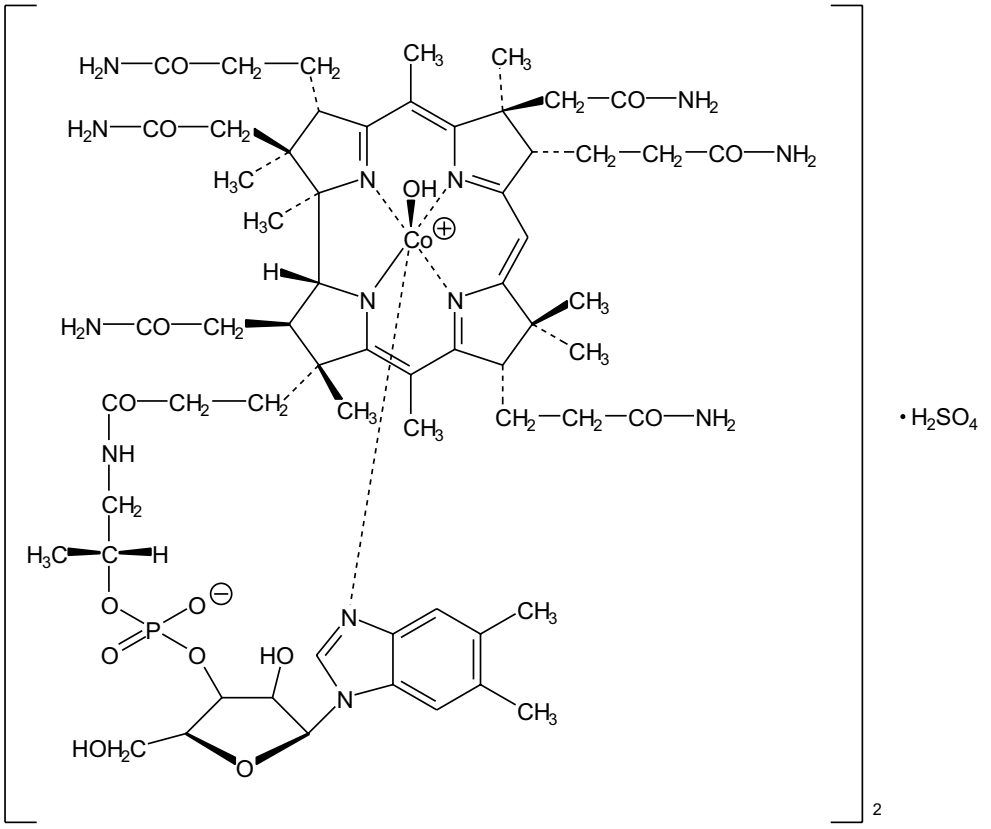
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

† Hydroxocobalamini sulfas

Hydroxokobalaminsulfat



$C_{124}H_{180}Co_2N_{26}O_{34}P_2S$ M_r 2790,81

Je to bis{Coα-[α-(5,6-dimethylbenzimidazolyl)]-Coβ-hydroxokobamid}sulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{124}H_{180}Co_2N_{26}O_{34}P_2S$.

Vlastnosti

Tmavě červený krystalický prášek nebo tmavě červené krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi hygroskopický. Při sušení se může rozkládat.

Zkoušky totožnosti

A. 2,5 mg se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,8 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 10,9 g/l *octanu sodného R* a zředí se stejným roztokem na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 260 nm až 610 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 274 nm, při 351 nm a při 525 nm. Poměr absorbance v maximu při 274 nm k absorbanci v maximu při 351 nm je 0,75 až 0,83. Poměr absorbance v maximu při 525 nm k absorbanci v maximu při 351 nm je 0,31 až 0,35.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkouška se provede za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok. 2 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R*. *Porovnávací roztok*. 2 mg *hydroxokobalaminu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *methanolu R* (25 + 75) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*. *Použijí se čerstvě připravné roztoky za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 10 ml *vody R*. Po ochlazení se přidá 1 ml roztoku *chloraminu T R* (20 g/l) a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,05 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Pak se roztok protřepe a 5 min se nechá stát. Nastřikuje se ihned po přípravě.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku obsahujícího *kyselinu citronovou R* (15 g/l) a *hydrogenfosforečnan sodný R* (8,1 g/l) (19,5 + 80,5); průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 351 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající 4násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou tři hlavní píky a rozlišení mezi páry sousedících píků není menší než 3,0 a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je jeden hlavní pík s poměrem signálu k šumu nejméně 5.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 8,0 % až 16,0 %; 0,400 g se suší při 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

Během stanovení se roztoky chrání před světlem.

25,0 mg se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,8 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 10,9 g/l *octanu sodného R* a zředí se stejným roztokem na 1000,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku v maximu při 351 nm.

Vypočítá se obsah sloučeniny $C_{124}H_{180}Co_2N_{26}O_{34}P_2S$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 188.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

Hydroxyethylcellulosum

1998

Hydroxyethylcelulosa

CAS 9004-62-0

Je to částečně O-(2-hydroxyethylovaná)celulosa.

Vlastnosti

Bílý, nažloutle bílý nebo šedavě bílý prášek nebo granule. Je dobře rozpustná v horké vodě a ve studené vodě dává koloidní roztok. Je prakticky nerozpustná v acetonu, v lihu 96%, v etheru a v toluenu.

Zkoušky totožnosti

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zahřeje k varu; roztok zůstane čirý.

B. K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml roztoku *taninu R* (100 g/l); vznikne nažloutle bílá vločkovitá sraženina, která se rozpouští v *amoniaku zředěném RS1*.

C. 1 g se ve zkumavce asi 160 mm dlouhé pečlivě smíchá se 2 g jemně upráškovaného *síranu manganatého R*. Do horní části zkumavky 2 cm hluboko se vloží proužek filtračního papíru,

který je napuštěn čerstvě připravenou směsí objemových dílů roztoku *diethanolaminu R* (200 g/l) a roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) (1 + 11), jejíž pH bylo upraveno *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na hodnotu asi 9,8. Zkumavka se ponoří 8 cm hluboko do lázně se silikonovým olejem vyhřáté na 190 °C až 200 °C; proužek filtračního papíru se během 10 min zbarví modře. Současně se provede slepá zkouška.

D. 0,2 g se bez zahřátí úplně rozpustí v 15 ml roztoku *kyseliny sírové R* (700 g/l). Roztok se za promíchávání vleje do 100 ml ledové *vody R* a zředí se jí na 250 ml. K 1 ml tohoto roztoku se ve zkumavce za opatrného promíchávání a chlazení ve vodě s ledem přidá po kapkách 8 ml *kyseliny sírové R*. Poté se roztok zahřívá přesně 3 min ve vodní lázni a ihned se ochladí ve vodě s ledem. K ochlazené směsi se opatrně přidá 0,6 ml *ninhydrinu RS2*, dobře se promíchá a nechá se stát při 25 °C; ihned vznikne růžové zbarvení, které se během 100 min změní na fialové.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství odpovídající 1,0 g vysušené látky se za promíchávání disperguje v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a po 10 min se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml a míchá se do úplného rozpuštění.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 8,5; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita. 75 % až 140 % deklarované hodnoty. Množství odpovídající 2,00 g vysušené zkoušené látky se za promíchávání přenese do 50 ml *vody R,* zředí se jí na 100,0 g a míchá se do úplného rozpuštění. Stanoví se viskozita *(2.2.10)* pomocí rotačního viskozimetru při 25 °C a při:
- smykové rychlosti 100 s^{-1} pro látku s předpokládanou viskozitou pod 100 mPa.s,
- smykové rychlosti 10 s^{-1} pro látku s předpokládanou viskozitou 100 mPa.s až 20 000 mPa.s,
- smykové rychlosti 1 s^{-1} pro látku s předpokládanou viskozitou nad 20 000 mPa.s.

Jestliže je použití smykové rychlosti 1 s^{-1}, 10 s^{-1} nebo 100 s^{1} nevhodné, použije se smyková rychlost vyšší a smyková rychlost nižší a výsledku se dosáhne interpolací.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 30 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (1,0 %).

Dusičnany. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 19 ml *vody R*, 2 ml *amoniaku 26% R,* 0,5 ml roztoku *síranu manganatého R* (10 g/l) a 1 ml roztoku *sulfanilamidu R* (10 g/l). Přidá se 0,1 g granulovaného *zinku R*, nechá se 30 min stát za občasného zamíchání a potom se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (40). 10 ml filtrátu ve zkumavce se okyselí 2,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, přidá se 0,5 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (10 g/l) a nechá se 15 min stát; fialově červené zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 1 ml základního *roztoku dusičnanů (10 g NO_3/ml)* a 19 ml *vody R* (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml).*

Glyoxal. K 1,0 g se ve zkumavce se zabroušenou zátkou přidá 10,0 ml *ethanolu R.* Zkumavka se uzavře, mechanicky se třepe 30 min a odstřeďuje se. Ke 2,0 ml supernatantní tekutiny se přidá 5,0 ml roztoku *methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu R* (4 g/l) v roztoku *kyseliny octové R* 80% *(V/V)* ve *vodě R* a homogenizuje se třepáním. Po 2 h není roztok intenzivněji zbarven

než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 2,0 ml základního *roztoku glyoxalu (20 μg $C_2H_2O_2$ /ml)* místo 2,0 ml supernatantní tekutiny (200 μg/g).

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky *(M_T)* se přenese do 5ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g *(M_R)* zkoušené látky se přenese do 5ml lahvičky, přidá se 0,2 ml (odpovídá 225 mg) ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (b). K 0,1 ml *ethylenoxidu RS* v 5ml lahvičce se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou a zátka se upevní hliníkovým nebo polytetrafluoroethylenovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Podmínky statického head-space nástřiku jsou obvykle následující:
- rovnovážná teplota: 70 °C,
- doba ohřevu: 45 min,
- teplota převodové kapiláry: 75 °C,
- nosný plyn: *helium pro chromatografii R* nebo *dusík pro chromatografii R*,
- doba tlakování: 30 s,
- objem nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné nebo křemenné kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C,

Nastříkne se 1,0 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky acetaldehydu a ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 3,5.

Nastříkne se odděleně po 1,0 ml plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina plochy píku ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot M_{EO} \cdot C}{0{,}25 \cdot (A_R \cdot M_T - A_T \cdot M_R)}, \quad kde\ C = \frac{C_{EO}}{M_{EO} \cdot 10},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_s - plochu píku ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
M_{EO} - hmotnost absorbovaného ethylenoxidu použitého pro přípravu *etylenoxidu RS* v gramech,
M_T - hmotnost zkoušené látky ve zkoušeném roztoku v gramech,
M_R - hmotnost zkoušené látky v porovnávacím roztoku (a),
C - korekční faktor, viz vzorec,
C_{EO} - obsah ethylenoxidu v mg/ml stanovený titračně.

2-Chlorethanol. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. K 50 mg zkoušené látky *(M_T)* se do 20ml lahvičky přidají 2 μl *2-propanolu R*.

Porovnávací roztok. K 50 mg *(M_R)* zkoušené látky se do 20ml lahvičky přidají 2 μl *2-chlorethanolu RS*.

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou a zátka se upevní hliníkovým nebo polytetrafluoroethylenovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Podmínky head-space nástřiku jsou obvykle následující:

Baňka se propláchne heliem při průtokové rychlosti 20 ml/min. Lahvičky se zahřívají 40 min při 110 °C. Doba trvání nástřiku je 5 min. Plynové extrakty se převedou do odlučovače tvořeného z trubičky 13,6 cm dlouhé a vnitřního průměru 4 mm naplněné silanizovaným ethylvinylbenzen-divynilbenzenem-kopolymerem (100 mesh) udržovaného při 50 °C.

Odlučovač se rychle zahřeje na 210 °C a promývá se heliem s průtokovou rychlostí 5 ml/min a tlakuje se plynem analytická kolona.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kapilární křemenné kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,53 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0μm vrstvou *makrogolu 20 000 pro chromatografii R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 60 cm/s,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 6 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min do 110 °C, potom se zvyšuje rychlostí 8 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 260 °C.

Zaznamenají se chromatogramy zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku.

Obsah 2-chlorethanolu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot C}{(A_R \cdot M_T) - (A_T \cdot M_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku 2-chlorethanolu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku 2-chlorethanolu na chromatogramu porovnávacího roztoku,
M_T - hmotnost zkoušené látky ve zkoušeném roztoku v gramech,
M_R - hmotnost zkoušené látky v porovnávacím roztoku v gramech,
C - obsah 2-chlorethanolu v mikrogramech ve 2,0 ml *2–chlorethanolu RS*,

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede zjevná viskozita 2% roztoku v mPa.s.

Hydroxyethylmethylcellulosum

Hydroxyethylmethylcelulosa

Synonymum. Methylhydroxyethylcellulosum

CAS 9032-42-2

Je to částečně O-methylovaná a O-(2-hydroxyethylovaná) celulosa.

Vlastnosti

Bílý, nažloutle bílý nebo šedobílý prášek nebo granule. Ve vysušeném stavu je hygroskopická, prakticky nerozpustná v horké vodě, v acetonu, v ethanolu, v etheru a v toluenu. Rozpouští se ve studené vodě za vzniku koloidního roztoku.

Zkoušky totožnosti

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zahřeje za občasného promíchávání ve vodní lázni. Při teplotě nad 50 °C vzniká zákal nebo vločkovitá sraženina. Po ochlazení je roztok opět čirý.

B. K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml roztoku *taninu R* (100 g/l); vznikne nažloutle bílá vločkovitá sraženina, která se rozpouští v *amoniaku zředěném RS1*.

C. 1 g se ve zkumavce asi 160 mm dlouhé pečlivě smíchá se 2 g jemně upráškovaného *síranu manganatého R*. Do horní části zkumavky 2 cm hluboko se vloží proužek filtračního papíru, který je napuštěn čerstvě připravenou směsí objemových dílů roztoku *diethanolaminu R* 20% *(V/V)* a roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) (1 + 11), jejíž pH bylo upraveno *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na hodnotu asi 9,8. Zkumavka se ponoří 8 cm hluboko do lázně se silikonovým olejem vyhřáté na 190 °C až 200 °C; proužek filtračního papíru se během 10 min zbarví modře. Současně se provede slepá zkouška.

D. 0,2 g se bez zahřátí úplně rozpustí v 15 ml roztoku *kyseliny sírové R* (70%). Roztok se za promíchávání vleje do 100 ml ledové *vody R* a zředí se jí na 250 ml. K 1 ml tohoto roztoku se ve zkumavce za opatrného promíchávání a chlazení ve vodě s ledem přidá po kapkách 8 ml *kyseliny sírové R*. Poté se roztok zahřívá přesně 3 min ve vodní lázni a ihned se ochladí ve vodě s ledem. K ochlazené směsi se opatrně přidá 0,6 ml *ninhydrinu RS2*, dobře se promíchá a nechá se stát při 25 °C; ihned vznikne růžové zbarvení, které se během 100 min změní na fialové.

E. 1 ml roztoku S se naleje na skleněnou desku. Po odpaření vody vznikne tenký film.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství odpovídající 1,0 g vysušené látky se za promíchávání přenese do 50 g *vody prosté oxidu uhličitého R* zahřáté na 90 °C. Po ochlazení se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 g a míchá se do úplného rozpuštění.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 8,0; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita. 75 % až 140 % deklarované hodnoty. Množství odpovídající 6,00 g vysušené zkoušené látky se za promíchávání přenese do 150 g *vody R* zahřáté na 90 °C. 10 min se míchá vrtulovou míchačkou, potom se vloží na 40 min do lázně obsahující vodu s ledem a promíchává se do úplného rozpuštění. Hmotnost roztoku se upraví na 300 g a odstřeďuje se do odstranění vzduchu. Roztok se vytemperuje na (20 ± 1) °C a stanoví se viskozita *(2.2.10)* pomocí rotačního viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede zdánlivá viskozita 2% roztoku v milipascalsekundách.

Hydroxypropylcellulosum

Hydroxypropylcelulosa

CAS 9004-64-2

Je to částečně O-(2-hydroxypropylovaná) celulosa. Může obsahovat až 0,6 % oxidu křemičitého (SiO_2).

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý prášek nebo granule. Ve vysušeném stavu je hygroskopická, dobře rozpustná ve studené vodě, v kyselině octové ledové, v ethanolu, v methanolu, v propylenglykolu a ve směsi 10 objemových dílů methanolu a 90 objemových dílů dichlormethanu za tvorby koloidních roztoků, mírně rozpustná nebo těžce rozpustná v acetonu v závislosti na stupni substituce, prakticky nerozpustná v horké vodě, v ethylenglykolu a v toluenu.

Zkoušky totožnosti

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zahřeje za občasného promíchávání ve vodní lázni. Při teplotě nad 40 °C vzniká zákal nebo vločkovitá sraženina. Po ochlazení je roztok opět čirý.

B. K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml roztoku *taninu R* (100 g/l); vznikne nažloutle bílá vločkovitá sraženina, která se rozpouští v *amoniaku zředěném RS1*.

C. 1 g se ve zkumavce asi 160 mm dlouhé pečlivě smíchá se 2 g jemně upráškovaného *síranu manganatého R*. Do horní části zkumavky 2 cm hluboko se vloží proužek filtračního papíru, který je napuštěn čerstvě připravenou směsí objemových dílů roztoku *diethanolaminu R* 20% *(V/V)* a roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) (1 + 11), jejíž pH bylo upraveno *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na hodnotu asi 9,8. Zkumavka se ponoří 8 cm hluboko do lázně se silikonovým olejem vyhřáté na 190 °C až 200 °C; proužek filtračního papíru se během 10 min zbarví modře. Současně se provede slepá zkouška.

D. 0,2 g se bez zahřátí úplně rozpustí v 15 ml roztoku *kyseliny sírové R* (70%). Roztok se za promíchávání vleje do 100 ml ledové *vody R* a zředí se jí na 250 ml. K 1 ml tohoto roztoku se ve zkumavce za opatrného promíchávání a chlazení ve vodě s ledem přidá po kapkách 8 ml *kyseliny sírové R*. Poté se roztok zahřívá přesně 3 min ve vodní lázni a ihned se ochladí ve vodě s ledem. K ochlazené směsi se opatrně přidá 0,6 ml *ninhydrinu RS2*, dobře se promíchá a nechá se stát při 25 °C; ihned vznikne růžové zbarvení, které se během 100 min změní na fialové.

E. 1 ml roztoku S se naleje na skleněnou desku. Po odpaření vody vznikne tenký film.

F. 0,2 g látky se nerozpustí v 10 ml *toluenu R*, ale úplně se rozpustí v 10 ml *ethanolu R*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství odpovídající 1,0 g vysušené látky se za promíchávání přenese do 50 g *vody prosté oxidu uhličitého R* zahřáté na 90 °C. Po ochlazení se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 g a míchá se do úplného rozpuštění.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 8,5; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita. 75 % až 140 % deklarované hodnoty. Množství odpovídající 6,00 g vysušené zkoušené látky se za promíchávání přenese do 150 g *vody R* zahřáté na 90 °C. 10 min se míchá vrtulovou míchačkou, potom se vloží na 40 min do lázně obsahující vodu s ledem a promíchává se do úplného rozpuštění. Hmotnost roztoku se upraví na 300 g a odstřeďuje se do odstranění vzduchu. Roztok se vytemperuje na (20 ± 1) °C a stanoví se viskozita *(2.2.10)* pomocí rotačního viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Pro látku s nízkou viskozitou se použije k přípravě roztoku množství v koncentraci uvedené v označení.

Oxid křemičitý. Nejvýše 0,6 %. Zbytek získaný ve zkoušce Síranový popel se zvlhčí dostatečným množstvím *lihu 96% R* a po malých dávkách se přidá 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R*.

Odpaří se do sucha při 95 °C až 105 °C tak, aby nevznikly ztráty prskáním. Ochladí se, stěny platinového kelímku se opláchnou 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R*, přidá se 0,5 ml *kyseliny sírové R* a odpaří se do sucha. Za postupného zvyšování teploty se vyžíhá při 900 °C, nechá se ochladit

v exsikátoru a zváží se. Rozdíl hmotnosti síranového popela a hmotností konečného zbytku odpovídá množství oxidu křemičitého ve zkoušené látce.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 7,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1,6 %; stanoví se s 1,00 g za použití platinového kelímku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zdánlivá viskozita 2% roztoku v milipascalsekundách,
- pro látku s nižší viskozitou koncentrace zkoušeného roztoku a zdánlivá viskozita v milipascalsekundách,
- kde je to vhodné, obsah oxidu křemičitého.

Hydroxypropylmethylcellulosi phthalas

Ftalat hydroxypropylmethylcelulosy

Synonyma. Methylhydroxypropylcellulosi phthalas, Hypromellosi phthalas

CAS 9050-31-1

Je to monoester kyseliny ftalové s hydroxypropylmethylcelulosou. Obsahuje methoxy- ($-OCH_3$) a 2-hydroxypropoxy- ($-OCH_2CHOHCH_3$) skupiny a 21,0 % až 35,0 % ftalyl(*o*-karboxybenzoyl $C_8H_5O_3$) skupin, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílé až lehce bělavé sypké vločky nebo zrnitý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve směsi stejných objemových dílů acetonu a methanolu a ve směsi stejných objemových dílů methanolu a dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v acetonu a v toluenu, prakticky nerozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. ftalatu hydroxypropylmethylcelulosy.*

B. Asi 40 mg se rozpustí ve směsi 1 ml směsi stejných objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R*. Roztok se naleje na skleněnou desku a vysuší se; vznikne bezbarvý průhledný film.

Zkoušky na čistotu

Volná kyselina ftalová. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí za použití ultrazvukové lázně asi v 50 ml *acetonitrilu R,* přidá se 10 ml *vody R* ochladí se na pokojovou teplotu a zředí se *acetonitrilem R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok. 5,0 mg *kyseliny ftalové R* se rozpustí ve 125 ml *acetonitrilu R,* přidá se 25 ml *vody R* a zředí se *acetonitrilem R* na 250,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné oktadecylsilanem chemicky vázaným na porézní oxid křemičitý nebo keramické mikročástice (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztok *kyseliny kyanoctové R* (8,5 g/l) (15 + 85), průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku, kromě píku rozpouštědla, nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího kyselině ftalové není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Chloridy. 1,0 g se rozpustí ve 40,0 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS*, přidá se 0,05 ml *fenolftaleinu RS* a po kapkách a za stálého míchání *kyselina dusičná zředěná RS* do odbarvení roztoku.

Přidá se za stálého míchání 20,0 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zahřívá se na vodní lázni za míchání, dokud granulát nepřejde na gelovitou sraženinu. Ochladí se a odstřeďuje se. Oddělí se kapalná fáze a zbytek se promyje třikrát 20 ml *vody R*, promývací tekutiny se oddělí a odstřeďuje se. Kapalné fáze se spojí, přidá se 5,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS,* zředí se na 200,0 ml *vodou R*, promíchá se a zfiltruje se. 50,0 ml filtrátu neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený za použití 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS*, 10,0 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS*, 7 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 5,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a zředěním na 50,0 ml *vodou R* (0,07 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky za použití 50 ml *methanolu bezvodého R* jako rozpouštědla.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *vody R, acetonu R* a *lihu 96% R* (1 + 2 + + 2), přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* až do slabě růžového zbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah ftaloylových skupin *(P)* vyjádřený v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\frac{149n}{(100 - a)m} - 1{,}795S ,$$

v němž značí:
a - obsah vody v procentech,
m - navážku zkoušené látky v gramech,

n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* v mililitrech,
S - obsah volné kyseliny ftalové v procentech (viz Zkoušky na čistotu).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Hydroxypropylmethylcellulosum

Hydroxypropylmethylcelulosa

Synonyma. Methylhydroxypropylcellulosum, Hypromellosum

CAS 9004-65-3

Je to částečně O-methylovaná a O-(2-hydroxypropylovaná) celulosa.

Vlastnosti

Bílý, nažloutle bílý nebo šedobílý prášek nebo granule. Ve vysušeném stavu je hygroskopická, prakticky nerozpustná v horké vodě, v acetonu, v ethanolu, v etheru a v toluenu. Látka se rozpouští ve studené vodě za vzniku koloidního roztoku.

Zkoušky totožnosti

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zahřeje za občasného promíchávání ve vodní lázni. Při teplotě nad 50 °C vzniká zákal nebo vločkovitá sraženina. Po ochlazení je roztok opět čirý.

B. K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml roztoku *taninu R* (100 g/l); vznikne nažloutle bílá vločkovitá sraženina, která se rozpouští v *amoniaku zředěném RS1*.

C. 1 g se ve zkumavce asi 160 mm dlouhé pečlivě smíchá se 2 g jemně upráškovaného *síranu manganatého R*. Do horní části zkumavky 2 cm hluboko se vloží proužek filtračního papíru, který je napuštěn čerstvě připravenou směsí objemových dílů roztoku *diethanolaminu R* 20% *(V/V)* a roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) (1 + 11), jejíž pH bylo upraveno *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na hodnotu asi 9,8. Zkumavka se ponoří 8 cm hluboko do lázně se silikonovým olejem vyhřáté na 190 °C až 200 °C; proužek filtračního papíru se během 10 min zbarví modře. Současně se provede slepá zkouška.

D. 0,2 g se bez zahřátí úplně rozpustí v 15 ml roztoku *kyseliny sírové R* (70%). Roztok se za promíchávání vleje do 100 ml ledové *vody R* a zředí se jí na 250 ml. K 1 ml tohoto roztoku se ve zkumavce za opatrného promíchávání a chlazení ve vodě s ledem přidá po kapkách 8 ml *kyseliny sírové R*. Poté se roztok zahřívá přesně 3 min ve vodní lázni a ihned se ochladí ve vodě s ledem. K ochlazené směsi se opatrně přidá 0,6 ml *ninhydrinu RS2*, dobře se promíchá a nechá se stát při 25 °C; ihned vznikne růžové zbarvení, které se během 100 min změní na fialové.

E. 1 ml roztoku S se naleje na skleněnou desku. Po odpaření vody vznikne tenký film.

F. 0,2 g látky se nerozpustí v 10 ml *toluenu R*, ani v 10 ml *ethanolu R*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství odpovídající 1,0 g vysušené látky se za promíchávání přenese do 50 g *vody prosté oxidu uhličitého R* zahřáté na 90 °C. Po ochlazení se upraví hmotnost *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 g a míchá se do úplného rozpuštění.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 8,0; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita. 75 % až 140 % deklarované hodnoty. Množství odpovídající 6,00 g vysušené zkoušené látky se za promíchávání přenese do 150 g *vody R* zahřáté na 90 °C. 10 min se míchá vrtulovou míchačkou, potom se vloží na 40 min do lázně obsahující vodu s ledem a promíchává se do úplného rozpuštění. Hmotnost roztoku se upraví na 300 g a odstřeďuje se do odstranění vzduchu. Roztok se vytemperuje na (20 ± 1) °C a stanoví se viskozita *(2.2.10)* pomocí rotačního viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

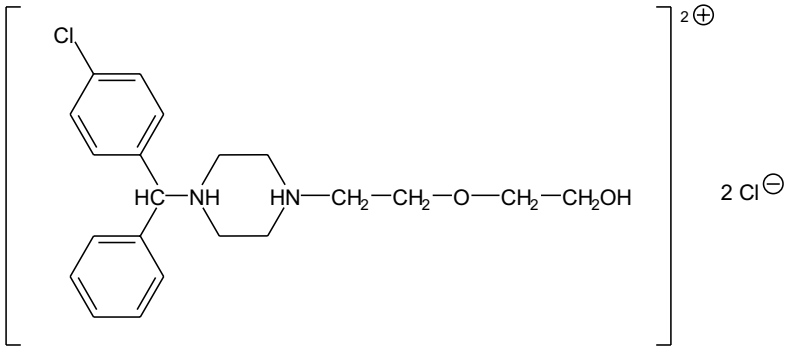
Označování

V označení na obalu se uvede zdánlivá viskozita 2% roztoku v milipascalsekundách.

† Hydroxyzini dihydrochloridum

Hydroxyziniumdichlorid

Synonymum. Hydroxyzini hydrochloridum



$C_{21}H_{29}Cl_3N_2O_2$ M_r 447,83 CAS 2192-20-3

Je to (*RS*)-1-(4-chlorfenyl)fenylmethyl-4-[-1-(1-hydroxyethyl)oxyethyl]piperaziniumdichlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{29}Cl_3N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 200 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *hydroxyziniumdichloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,50 g *hydroxyziniumdichloridu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,50 g *mekloziniumchloridu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *toluenu R* (1 + 24 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným RS2*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, velikostí a zbarvením s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

C. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 15 ml. Přidá se 15 ml nasyceného roztoku *trinitrofenolu R* v *lihu 96% R* a nechá se 15 min stát. Vzniklá sraženina se odfiltruje a rekrystalizuje z *lihu 96% R*. Pro začátek krystalizace je nezbytné třít stěny zkumavky skleněnou tyčinkou. Krystaly tají *(2.2.14)* při 189 °C až 192 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *hydroxyziniumdichloridu CRL* a 5,0 mg *hydroxizinu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 3,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 200,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,12 m dlouhé a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny sírové zředěné RS, vody R* a *acetonitrilu R* (0,6 + 9,4 + 90). Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky dvou píků nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (hydroxyzin nečistota A) a druhým píkem (hydroxyzin) je nejméně 1,5.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 40 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

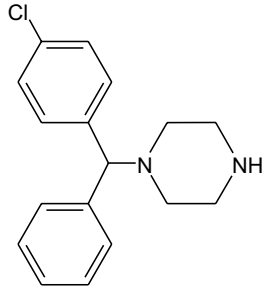
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,39 mg $C_{21}H_{29}Cl_3N_2O_2$.

Uchovávání

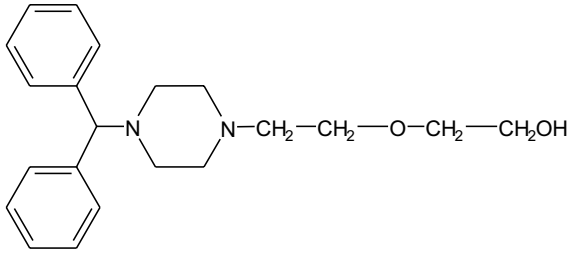
Ve vzduchtěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



A. 1-[(4-chlorfenyl)fenylmethyl]piperazin,

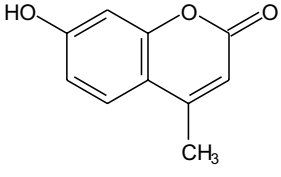


B. 4-dechlorhydroxyzin (dekloxizin).

† Hymecromonum

N

Hymechromon



$C_{10}H_8O_3$ M_r 176,17 CAS 90-33-5

Je to 7-hydroxy-4-methyl-2*H*-1-benzopyran-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{10}H_8O_3$.

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a mírně rozpustný v lihu 96 %.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zasady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 186 °C až 191 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *hymechromonu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, resorcinol, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 0,5 mg se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R,* přidá se 1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a 8 ml *vody R;* vznikne intenzivně modrá fluorescence.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,250 g se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *lihu R* 70% (*V/V*). Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 6,5; měří se následující roztok: 1,0 g se 5 min třepe s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se.

Příbuzné látky, resorcinol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Zkouška se provede za chránění před světlem. Nanášejí se čerstvě připravené roztoky.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,20 g *hymechromonu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *resorcinolu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 25 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (5 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a při 366 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Potom se vrstva postříká směsí stejných objemových dílů *chloridu železitého RS1* a roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (10 g/l) a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku případně přítomná skvrna odpovídající resorcinolu nepřevyšuje velikostí a intenzitou zbarvení skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,05 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 5 ml *dimethylformamidu R*, přidá se 20 ml *lihu 96% R*, 10 min se probublává proudem *dusíku R* a za stálého probublávání dusíkem se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,62 mg $C_{10}H_8O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. resorcinol.

† Hyoscyami folium

Blínový list

Synonymum. Folium hyoscyami

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Hyoscyamus niger* L.

Obsahuje nejméně 0,05 % alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$; M_r 289,4), vztaženo na vysušenou drogu. Alkaloidy tvoří zejména hyoscyamin provázený proměnlivým množstvím hyoscinu (skopolaminu).

Vlastnosti

Droga má nepříjemný pach nutkající ke zvracení.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listy žlutozelené až hnědozelené, křehké, často rozdrcené. Báze přízemních listů srdčitá, řapíkatých listů špičatá. Čepel zašpičatělá, okraj laloků čepele nepravidelně zubatý. Listy na obou stranách hustě chlupaté a lepkavé. Střední žilka je široká, zřetelně vyniklá, postranní žilky s ní svírají široký úhel a končí ve hrotech zubů listové čepele. Stonky jsou duté, válcovité. Květní vrcholky hustě chlupaté, kompaktní. Květy jsou nahloučené, hustě chlupaté, kryté velkými listeny. Květy mají srostloplátečný, široce zvonkovitý kalich s pěti trojúhelníkovitými, zašpičatělými ušty. Koruna pěticípá, krátce nálevkovitá, nažloutlá s hnědou žilnatinou. Plod je tobolka, v době zralosti asi 1,5 cm dlouhá, uzavřená v přirostlém vytrvalém lepkavém kalichu. Semena četná, hnědošedá se zprohýbaným, síťovitým osemením.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele s buňkami pokožky se zvlněnými stěnami a hladkou kutikulou; anizocytické a anomocytické průduchy (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu. Mnohobuněčné, jednořadé krycí chlupy a žláznaté chlupy s tenkými hladkými stěnami; žláznaté chlupy mají dlouhé mnohobuněčné nohy nebo krátké jednobuněčné nohy a dvoubuněčné nebo mnohobuněčné kyjovité hlavičky. Dorziventrální mezofyl s jednořadým parenchymem a houbovým parenchymem obsahujícím jednoduché nebo zdvojené krystaly šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. V práškované droze mohou být patrna: vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; kulovitá pylová zrna o průměru až 60 μm, se třemi klíčními póry, s téměř hladkou exinou, úlomky koruny s papilózní pokožkou; úlomky semen obsahující žlutohnědé, zprohýbané, ztlustlé sklereidy osemení; občas drúzy nebo písek šťavelanu vápenatého.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografie, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů.

D. 1 g práškované drogy (180) se protřepává 2 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*. Zfiltruje se, k filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Protřepává se opatrně s 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R* tak, aby se netvořila emulze. Etherová vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a pak se zfiltruje. Ether se odpaří na porcelánové misce, přidá se

0,5 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného (30 g/l) v lihu 96% R;* vznikne tmavě fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 2,0 g práškované drogy (180) se protřepává 15 min s 20 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a pak se zfiltruje. Filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do konečného objemu 25 ml filtrátu. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R.* Je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené etherové výtřepky se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R.*

Porovnávací roztok. 50 mg *hyoscyaminiumsulfatu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R.* 15 mg *skopolaminiumbromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.* 3,8 ml roztoku hyoscyaminiumsulfatu a 4,2 ml skopolaminiumbromidu se zředí methanolem R na 10 ml.

Nanese se odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl a 20 μl obou roztoků; vzdálenost mezi jednotlivými pruhy je 1 cm. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné i další skvrny; při nanášce 20 μl ve střední části chromatogramu, při nanášce 10 μl v blízkosti startu. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná. Pozoruje se po 15 min. Skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, nejsou však šedomodré (atropin), další skvrny již nejsou patrné.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2,5 % stonků o průměru větším než 7 mm.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 30,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 12,0 %.

Stanovení obsahu

Asi 100 g dobře zhomogenizované drogy se upráškuje (180). Práškovaná droga se použije ke zkouškám Ztráta sušením a Celkové alkaloidy.

a) Ztráta sušením (*2.2.32*). 2,000 g práškované drogy (180) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

b) Celkové alkaloidy. 40,0 g práškované drogy (180) se povlhčí směsí složenou z 8 ml *amoniaku 17,5% RS*, 10 ml *lihu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi a nechá se 4 h stát. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát nereaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a přítomnost alkaloidů se ověří *tetrajodortuťnatanem draselným RS.* Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a pomocí *etheru prostého peroxidických látek R* se převede do dělicí nálevky. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho

objem tvořil nejméně 2,1násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepává se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené spodní vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a protřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R*, nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Chloroform se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l RS;* chloroform se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor R* a nadbytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS.*

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$), se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{57{,}88\ .\ (20\ -\ n)}{(100\ -\ d)\ .\ m}\ ,$$

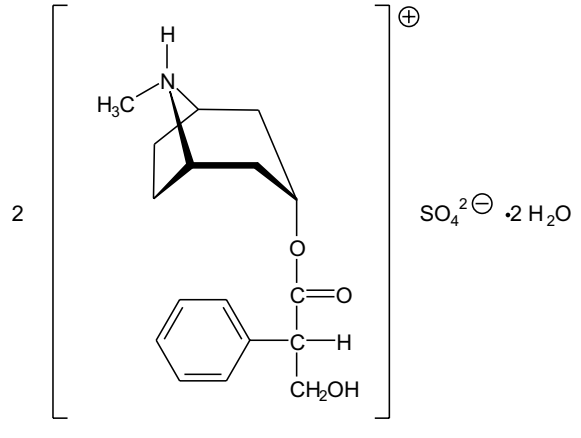
v němž značí:
d - ztrátu sušením v procentech,
n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkem.
Separandum.

†† Hyoscyamini sulfas

Hyoscyaminiumsulfat



$C_{34}H_{48}N_2O_{10}S\ .\ 2H_2O$ M_r 712,85 CAS 6835-16-1
M_r bezvodého 676,82

Je to dihydrát bis[3α-(*S*)-tropoyloxy-1α*H*,5α*H*-tropanium] sulfatu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé jehličkovité krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 203 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum zkoušené látky *(2.2.24)* se shoduje se spektrem *hyoscyaminiumsulfatu CRL.*

C. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zahřeje se. K horkému roztoku se přidají 4 ml *trinitrofenolu RS* a ochladí se za občasného protřepání. Vzniklé krystaly se promyjí dvakrát 3 ml ledové *vody R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Krystaly tají *(2.2.14)* při 164 °C až 168 °C.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R;* vzniká fialové zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,2; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -24° až -29°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (15 + 85) po dráze 10 cm v komoře předem nasycené *amoniakem 26% R* tak, že se do komory umístí válec s 10 ml *amoniaku 26% R.* Po vyjmutí z komory se vrstva suší 15 min při 100 °C až 105 °C a po ochlazení se stříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* do objevení se skvrn. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Apoatropin. 0,100 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku *(2.2.25)* při 254 nm. Specifická absorbance v maximu není větší než 4,0, počítáno na vysušenou látku (asi 0,5 % apoatropinu).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 2,0 % až 5,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C po dobu 20 h.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v *kyselině octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 67,7 mg $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

Hyperici herba

N

Třezalková nať

Synonymum. Herba hyperici

Jsou to usušené kvetoucí vrcholky druhu *Hypericum perforatum* L. Obsahuje nejméně 0,05 % hypericinu ($C_{30}H_{16}O_8$; M_r 504,5).

Vlastnosti

Droga slabého, charakteristického pachu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek jen nahoře větvený, oblý, se dvěma podélnými tenkými lištami, lysý. Listy vstřícné, vejčitě oválné, přisedlé, 15 mm až 20 mm dlouhé, celokrajné. Na okrajích listů černé, žláznaté chlupy, čepel s četnými malými olejovými nádržkami, prosvítavě tečkovaná. Květy pětičetné pravidelné, uspořádané v širokém vrcholíku vidlanů. Kališní lístky zelené, s ušty kopinatými, na okrajích s černými, žláznatými chlupy; korunní lístky zlatožluté na okrajích s černými, žláznatými chlupy; četné zlatožluté tyčinky uspořádané ve třech svazečcích. Semeník svrchní, třípouzdrý, blizna trojčetná, červená.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s anizocytickými průduchy (*2.8.3*); úlomky žebříčkovitě ztlustlých cév; červené olejové nádržky nebo jejich úlomky; četná jednotlivá nebo shlučená pylová zrna s třemi klíčními póry.

C. Práškovaná droga (355) se rozmačká mezi krycím a podložním sklíčkem. Pozoruje se ve *vodě R;* barví červenorůžově.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 %.

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*.

Zkoušený roztok. 10 g práškované drogy (355) se protřepává 15 min se 100 ml *methanolu R* a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Před nanášením roztoků se vrstva promyje *methanolem R* a usuší se na vzduchu. Na vrstvu se pak nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku a 5 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 20 + 100) po dráze 12 cm. Vrstva se suší nejprve na vzduchu a pak 2 min v proudu horkého vzduchu. Ještě horká vrstva se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik oranžových skvrn, z nichž jedna odpovídá polohou, velikostí a intenzitou skvrně hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku; dvě červené skvrny s hodnotou R_F asi 0,85 (hypericin) a R_F asi 0,80 (pseudohypericin); pod skvrnou odpovídající hyperosidu jsou patrné dvě světle modré skvrny (kyselina chlorogenová).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 1,00 g práškované drogy (355).

Stanovení obsahu

1,00 g práškované drogy (710) se extrahuje v Soxhletově přístroji *chloroformem R* tak dlouho, až zpět stéká bezbarvý chloroform. Tekutina se odstraní a droga se usuší volně na vzduchu. Pak se znovu extrahuje v Soxhletově přístroji *acetonem R* tak dlouho, až zpět stéká bezbarvý aceton. Tekutina se odpaří za sníženého tlaku do sucha, zbytek se rozpustí v *methanolu R*, převede se do odměrné baňky a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml. Tekutina se zfiltruje, první 2 ml filtrátu se odstraní. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 25,0 ml.

Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 590 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah hypericinu ($C_{30}H_{16}O_8$) v procentech, podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 0{,}174}{m} ,$$

v němž značí:

A - absorbanci zkoušeného roztoku při 590 nm,

m - navážku drogy v gramech.

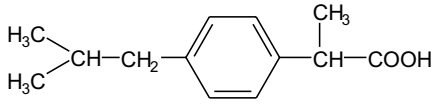
Specifická absorbance hypericinu je 718.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Ibuprofenum

Ibuprofen



$C_{13}H_{18}O_2$ M_r 206,28 CAS 15687-27-1

Je to kyselina (*RS*)-2-(4-isobutylfenyl)propionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{18}O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v etheru, v methanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 75 °C až 78 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 240 nm až 300 nm za použití spektrofotometru s šířkou pásu 1,0 nm a rychlostí záznamu nejvýše 50 nm/min. Roztok vykazuje prodlevu při 258 nm a dvě absorpční maxima: při 264 nm a při 272 nm. Poměr absorbance změřené v maximu při 264 nm k absorbanci změřené v prodlevě při 258 nm je 1,20 až 1,30. Poměr absorbance změřené v maximu při 272 nm k absorbanci změřené v prodlevě při 258 nm je 1,00 až 1,10.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ibuprofenu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *ibuprofenu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *ethylacetatu R* a *hexanu R* (5 + 25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 30 min při 120 °C a potom se lehce postříká roztokem *manganistanu draselného R* (10 g/l) v *kyselině sírové zředěné RS* a zahřívá se 20 min při 120 °C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,05° až +0,05°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g v *methanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve 2 ml *acetonitrilu R* a zředí se mobilní fázi na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *ibuprofenu CRL* se rozpustí ve 2 ml *acetonitrilu R*, přidá se 1 ml roztoku *kyseliny 2-(4-butylfenyl)propionové CRL* (0,06 g/l) v *acetonitrilu R* a zředí se mobilní fázi na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je roztok připravený takto: smíchají se objemové díly *kyseliny fosforečné R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (0,5 + 340 + 600), nechá se ustálit a zředí se *vodou R* na 1000 objemových dílů, průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází rychlostí 2 ml/min po dobu 45 min.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu byla 70 % až 90 % celého rozsahu stupnice zapisovače.

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek je retenční čas ibuprofenu asi 20 min. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b) a na získaném chromatogramu se měří výška *(A)* píku kyseliny 2-(4-butylfenyl)-propionové a výška *(B)* nejnižšího bodu křivky mezi tímto píkem a píkem ibuprofenu od základní linie. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška *A* je 1,5krát větší než výška *B*. V případě potřeby se upraví koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího kyselině 2-(4-butylfenyl)-propionové větší než plocha píku kyseliny 2-(4-butylfenyl)-propionové na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího kyselině 2-(4-butylfenyl)-propionové, není větší než 0,3násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %) a součet ploch takových píků není větší než 0,7násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,7 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k píkům s plochou menší, než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití roztoku olova (1 µg Pb/ml) připraveného zředěním základního *roztoku olova (100 µg Pb/ml) methanolem R.*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu nad *oxidem fosforečným R.*

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,450 g se rozpustí v 50 ml *methanolu R*, přidá se 0,4 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do červeného zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,63 mg $C_{13}H_{18}O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Nečistoty

A. kyselina 2-(3-isobutylfenyl)propionová,
B. kyselina 2-(4-butylfenyl)propionová,
C. 2-(4-isobutylfenyl)propionamid,
D. kyselina 2-(4-methylfenyl)propionová,
E. 4-isobutylacetofenon.

Ichthammolum

Ichthamol

Synonymum. Ichthamolum

CAS 8029-68-3

Je to produkt, který se získává destilací určitých živičných krystalických břidlic, následnou sulfonací získaného destilátu a jeho neutralizací amoniakem.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 50,0 % až 56,0 % sušiny, 4,5 % až 7,0 % celkového amoniaku (NH_3; *M*r 17,03), nejméně 10,5 % organicky vázané síry a nejvýše 20,0 % celkové síry ve formě síranu.

Vlastnosti

Hustá černohnědá kapalina, mísitelná s vodou a s glycerolem. Je těžce rozpustný v lihu 96%, v etheru, v mastných olejích a v tekutém parafinu. Tvoří homogenní směsi s voskem z ovčí vlny a s vazelínou.

Zkoušky totožnosti

A. 1,5 g se rozpustí v 15 ml *vody R* (roztok A). Ke 2 ml roztoku A se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R;* vznikne pryskyřičná sraženina. Tekutina nad sraženinou se slije. Sraženina je částečně rozpustná v *etheru R*.

B. 2 ml roztoku A ze zkoušky A, vyhovují zkoušce na amonné soli a soli těkavých bází *(2.3.1)*.

C. Směs roztoku A a *hydroxidu sodného zředěného RS* získaná ve zkoušce B se odpaří a vyžíhá. Zbytek se smíchá s 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS;* uvolňující se páry barví *papír s octanem olovnatým R* hnědě nebo černě. Roztok se zfiltruje; filtrát vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10,0 ml čirého filtrátu získaného ve zkoušce Celkový amoniak se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,040 až 1,085; stanoví se se směsí stejných objemových dílů zkoušené látky a *vody R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Sušina. Do odvážené váženky obsahující 2 g *písku R* předem vysušeného do konstantní hmotnosti se přenese 1,000 g zkoušené látky a malá skleněná tyčinka. Zahřívá se 2 h na vodní lázni za častého míchání a suší se v sušárně při 100 °C až 105 °C tak dlouho, dokud rozdíl dvou po sobě následujících vážení není větší než 2,0 mg. Druhé vážení následuje po opakovaném hodinovém sušení.

Celkový amoniak. 2,50 g se rozpustí ve 25 ml teplé *vody R*, převede se do 250ml odměrné baňky, přidá se 200 ml *chloridu sodného RS* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Roztok se zfiltruje a prvních 20 ml filtrátu se odstraní. Ke 100,0 ml čirého filtrátu se přidá 25 ml *formaldehydu RS* předem zneutralizovaného na *fenolftalein RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do slabě růžového zabarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 1,703 mg NH_3.

Organicky vázaná síra. 0,500 g se v asi 50ml porcelánové misce smíchá se 4 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a s 3 ml *dichlormethanu R* a zahřívá se za stálého míchání, dokud se všechen dichlormethan neodpaří. Potom se přidá 10 g hrubě práškovaného *dusičnanu měďnatého R*, důkladně se promíchá a směs se velmi opatrně zahřívá nad malým plamenem. Po proběhnutí reakce se zvýší teplota a zahřívá se tak dlouho, až reakční směs zčerná. Po vychladnutí se miska umístí do velké kádinky a přidá se 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Po proběhnutí reakce se přidá 100 ml *vody R*, zahřeje se k varu a zahřívá se, dokud se všechen oxid měďnatý nerozpustí. Roztok se zfiltruje, filtrát se zředí 400 ml *vody R*, zahřeje se k varu a přidá se 20 ml *chloridu barnatého RS1*. Nechá se stát 2 h a zfiltruje se. Filtr se sraženinou se po promytí *vodou R* usuší a žíhá při asi 600 °C, dokud se dvě následující vážení neliší o více než 0,2 % hmotnosti zbytku.

1 g zbytku odpovídá 0,1374 g celkové síry.

Vypočítá se obsah síry v procentech a odečte se procentuální obsah síry ve formě síranu.

Síra ve formě síranu. 2,000 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidají se 2 g *chloridu měďnatého R* rozpuštěné v 80 ml *vody R*, zředí se *vodou R* na 200,0 ml, promíchá se a zfiltruje. 100,0 ml filtrátu se zahřeje téměř k varu, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a po kapkách 5 ml *chloridu barnatého RS1* a zahřeje se na vodní lázni. Zfiltruje se, sraženina se promyje *vodou R*, vysuší se a žíhá při teplotě asi 600 °C, dokud se dvě následující vážení neliší o více než 0,2 % hmotnosti zbytku.

1 g zbytku odpovídá 0,1374 g síry ve formě síranů.

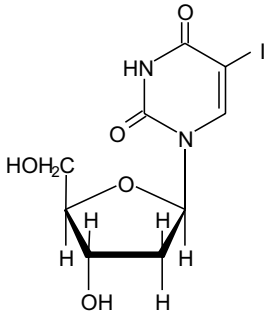
Vypočítá se obsah síry ve formě síranů v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Idoxuridinum

Idoxuridin



$C_9H_{11}IN_2O_5$ M_r 354,10 CAS 54-42-2

Je to 1-(2-deoxy-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-jod-2,4(1*H*,3*H*)pyrimidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{11}IN_2O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 180 °C za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *idoxuridinu CRL*. Tablety se připraví odděleně za použití 1 mg zkoušené látky a 1 mg referenční látky a po 0,3 g *bromidu draselného R*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

C. Asi 5 mg se zahřívá ve zkumavce nad plamenem; vyvíjejí se fialové páry.

D. Asi 2 mg se disperguje v 1 ml *vody R*, přidají se 2 ml *difenylaminu RS2* a 10 min se zahřívá ve vodní lázni; vzniká trvalé světle modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředí se jím na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 6,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,10 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +28° až +32°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 5) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 5) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *5-jodouracilu R*, 20 mg *2′-deoxyuridinu R* a 20 mg *5-brom-2′-deoxyuridinu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 5) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,20 g zkoušené látky se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 20 mg *idoxuridinu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 5) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (d). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 5) na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se dvakrát směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *chloroformu R* a *2-propanolu R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se po každém vyvíjení usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádné skvrny odpovídající 5-jodouracilu, 2′-deoxyuridinu a 5-brom-2′-deoxyuridinu nejsou intenzivnější než odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících 5-jodouracilu, 2′-deoxyuridinu a 5-brom-2′-deoxyuridinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

Jodidy. 0,25 g se rozpustí ve 25 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS*, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 50 ml. Nechá se stát 10 min a zfiltruje se. K 25 ml filtrátu se přidá 5 ml *peroxidu vodíku zředěného RS* a 10 ml *chloroformu R* a protřepe se. Růžové zbarvení chloroformové vrstvy není intenzivnější než zbarvení chloroformové vrstvy porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 1 ml roztoku *jodidu draselného R* (0,33 g/l) místo zkoušené látky (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3000 g se rozpustí ve 20 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,41 mg $C_9H_{11}IN_2O_5$.

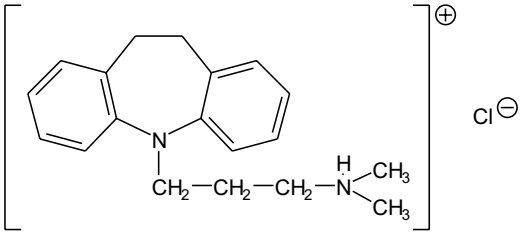
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Imipramini hydrochloridum

Imipraminiumchlorid

Synonymum. Imipraminium chloratum



$C_{19}H_{25}ClN_2$ M_r 316,87 CAS 113-52-0

Je to {3-[5-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepinyl)]propyl}dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{25}ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý až slabě žlutý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 170 °C až 174 °C.

B. 20 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 10,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 251 nm a prodlevu při 270 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 260.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *imipraminiumchloridu CRL*.

D. Asi 5 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné R;* vzniká intenzivně modré zbarvení.

E. Asi 50 mg se rozpustí ve 3 ml *vody R* a přidá se 0,05 ml roztoku *hydrochinonu R* (25 g/l) v *methanolu R;* během 15 min nevzniká červené zbarvení.

F. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Ke 3,0 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R,* rychle se rozpustí třepáním a rozmělněním skleněnou tyčinkou a zředí se stejným rozpuštědlem na 30 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)*. Ihned po přípravě se zředí stejným objemem *vody R*. Tento roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,6 až 5,0; měří se roztok S ihned po přípravě.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Připravuje se v čas potřeby.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *iminodibenzylu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R*, *vody R, kyseliny octové ledové R* a *ethylacetatu R* (5 + 5 + 35 + 55) po dráze 12 cm. Vrstva se nechá 5 min sušit a potom se postříká roztokem *dichromanu draselného R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (1 + 4) a ihned se pozoruje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá hlavní skvrna. Žádná skvrna odpovídající iminodibenzylu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající iminodibenzylu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *chloroformu R* a přidá se 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *žluti metanilové RS* jako indikátoru.

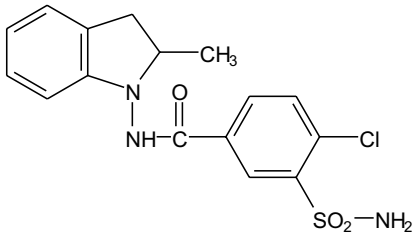
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,69 mg $C_{19}H_{25}ClN_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Indapamidum

Indapamid



$C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ M_r 365,83 CAS 26807-65-8

Je to (*RS*)-4-chlor-3-sulfamoyl-N-(2,3-dihydro-2-methyl-1*H*-indol-1-yl)benzamid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 242 nm a dvě ramena, při 279 nm a při 287 nm. Specifická absorbance v maximu je 590 až 630.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *indapamidu CRL*. Tablety se připraví za použití *bromidu draselného R*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *indapamidu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *indometacinu CRL* se rozpustí v 5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R* a *toluenu R* (1 + 20 + 79) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,02° až +0,02°. 0,250 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)* způsobem popsaným ve Stanovení obsahu.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 15 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se po 10 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je rozlišení mezi píkem indapamidu a píkem methylnitrosoindolinu nejméně 4,0 a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je poměr signálu hlavního píku k šumu nejméně 6.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku indapamidu nečistoty B větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku indapamidu nečistoty B, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Methylnitrosoindolin. Nejvýše 5 μg/g; provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Zkouška se provede za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v 1 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml. Protřepává se 15 min, nechá se stát 1 h při 4 °C a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 25,0 mg se rozpustí v 1,0 ml roztoku *methylnitrosoindolinu CRL* (0,125 mg/l) v *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml. Protřepává se 15 min, nechá se stát 1 h při 4 °C a pak se zfiltruje.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecysilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R, tetrahydrofuranu R* a roztoku *triethanolaminu R* (1,5 g/l), jehož hodnota pH byla upravena na 2,8 *kyselinou fosforečnou R*, (7 + 20 + 73). Průtoková rychlost je 1,4 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 305 nm,

Teplota kolony se udržuje na 30 °C.

Nastřikuje se po 0,1 ml roztoků.

Na chromatogramu porovnávacího roztoku se změří od základny výška *A* píku methylnitrosoindolinu, který je těsně před hlavním píkem, a výška *B* nejnižšího bodu křivky mezi píkem methylnitrosoindolinu a hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku rozdíl mezi *A* a *B* je nejméně 85 % výšky *A* a poměr signálu píku methylnitrosoindolinu, který je těsně před hlavním píkem, k šumu je nejméně 3.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího methylnitrosoindolinu není větší než rozdíl mezi plochami píků methylnitrosoindolinu na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 0,10 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkouška se provede za ochrany před světlem a roztoky se připravují v čas potřeby nebo se uchovávají při teplotě do 4 °C.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v 7 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se roztokem *edetanu disodného R* (0,2 g/l) na 20,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 30,0 mg *indapamidu nečistoty B CRL* se rozpustí ve 35 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se roztokem *edetanu disodného R* (0,2 g/l) na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 35 ml stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se roztokem *edetanu disodného R* (0,2 g/ml) na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R, methanolu R* a roztoku *edetanu disodného R* (0,2 g/l) (17,5 + 17,5 + 65) na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R, methanolu R* a roztoku *edetanu disodného R* (0,2 g/ml) (17,5 + 17,5 + 65) na 20,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *indapamidu CRL* se rozpustí v 7 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se roztokem *edetanu disodného R* (0,2 g/l) na 20,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 25,0 mg *indapamidu CRL* a 45,0 mg *methylnitrosoindolinu CRL* se rozpustí v 17,5 ml směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se roztokem *edetanu disodného R* (0,2 g/l) na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,20 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, acetonitrilu R, methanolu R* a roztoku *edetanu disodného R* (0,2 g/l) (0,1 + 17,5 + 17,5 + 65). Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek je retenční čas hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) asi 11 min. Porovnávací roztok (c) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku indapamidu je nejvýše 1,0 %. V případě potřeby se upraví parametry integrátoru. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztok (c).

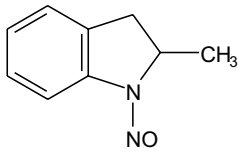
Obsah bezvodé látky se vypočítá v procentech.

Uchovávání

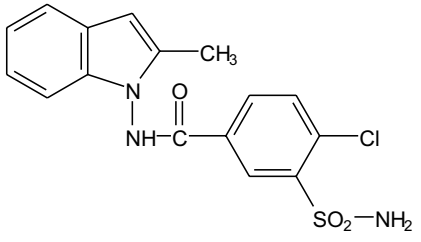
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



A. 2-methyl-1-nitrosoindolin,

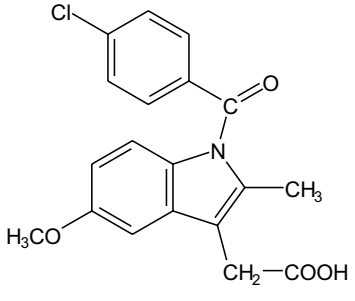


B. 4-chlor-3-(sulfamoyl)-N-(2-methyl-1*H*-indol-1-yl)benzamid.

† Indometacinum

Indometacin

Synonymum. Indomethacinum



$C_{19}H_{16}ClNO_4$ M_r 357,79 CAS 53-86-1

Je to kyselina [1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolyl]octová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{19}H_{16}ClNO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 158 °C až 162 °C.

B. 25 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 300 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 318 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 170 až 190.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *indometacinu CRL*. Zkouší se látky v pevném stavu bez rekrystalizace.

D. 0,1 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 10 ml *lihu 96% R*. K 0,1 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (250 g/l) a *hydroxidu sodného zředěného RS* (1 + 3), přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 1 ml *chloridu železitého RS2* a promíchá se; vzniká fialovorůžové zbarvení.

E. K 0,5 ml lihového roztoku ze zkoušky D se přidá 0,5 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS2;* vznikne sraženina, která se po protřepání rozpustí. Zahřeje se na vodní lázni; roztok se zbarví modrozeleně. Pokračuje se v zahřívání po dobu 5 min a potom se 2 min chladí v ledové vodě; vznikne sraženina a barva roztoku se změní na světle šedozelenou. Přidají se 3 ml *lihu 96% R;* roztok je čirý a fialovorůžového zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*. Vrstva se připraví za použití roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (46,8 g/l).

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Připravuje se v čas potřeby.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru petrolejového R* a *etheru R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

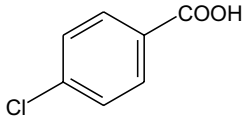
0,300 g se rozpustí v 75 ml *acetonu R*, který byl 15 min probubláván *dusíkem R* prostým oxidu uhličitého a za stálého probublávání konstantním proudem dusíku se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,78 mg $C_{19}H_{16}ClNO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



A. kyselina 4-chlorbenzoová.

† Insulinum

Insulin

$C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$ (prasečí) M_r 5777,58 CAS 12584-58-6
$C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$ (hovězí) M_r 5733,52

Je to čištěná přírodní antidiabetická látka získaná z hovězí nebo prasečí slinivky břišní. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 105,0 % prasečího insulinu $C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$ nebo hovězího insulinu $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$.

1 m.j. insulinu odpovídá 0,035 mg bezvodého insulinu.

Výroba

Insulin je vyráběn za podmínek minimalizujících mikrobiální znečištění.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu a v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a za rozkladu ve zředěných alkalických hydroxidech.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Nečistoty s molekulovou hmotností větší než insulin, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Absorbance *(2.2.25)*. 5,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml. Specifická absorbance v maximu při 276 nm je 9,6 až 11,2, počítáno na vysušenou látku.

Nečistoty s molekulovou hmotností větší než insulin. Provede se vylučovací chromatografie *(2.2.30)*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 1,0 ml mobilní fáze.
Porovnávací roztok (a). 100 µl zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). Rozpustí se obsah lahvičky *prasečího insulinu CRL* nebo *hovězího insulinu CRL* v mobilní fázi tak, aby byla získána koncentrace 10 mg/ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,6 m a vnitřního průměru nejméně 7,5 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (10 µm; velikost pórů asi 13 nm),
- mobilní fáze, kterou je zfiltrovaná a odplyněná směs připravená takto: 20 objemových dílů *kyseliny octové ledové R* se smíchá s 50 objemovými díly *vody R*, nastaví se pH na hodnotu 3,0 roztokem *amoniaku R* (25% *V/V),* přidá se 30 objemových dílů *acetonitrilu R* a promíchá. Průtoková rychlost je 0,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 276 nm.

Nastříkne se odděleně po 50 µl každého roztoku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby velikost hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) byla 50 % až 70 % rozsahu celé stupnice zapisovače. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků eluovaných před hlavním píkem není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %).

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 40,0 mg se rozpustí v 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS.*
Porovnávací roztok (a). Obsah lahvičky *prasečího insulinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* tak, aby výsledný roztok obsahoval 4,0 mg/ml.
Porovnávací roztok (b). Obsah lahvičky *lidského insulinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* tak, aby výsledný roztok obsahoval 4,0 mg/ml.
Porovnávací roztok (c). Je-li třeba použít hovězí insulin, rozpustí se 40,0 mg *hovězího insulinu CRL* v 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS.*
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (b).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou jsou následující roztoky připravené a uchováné při teplotě nepřevyšující 20 °C:
  - *mobilní fáze A* - 28,4 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml. Přidá se 2,7 ml *kyseliny fosforečné R*, a je-li třeba, upraví se pH na hodnotu 2,3 *ethanolaminem R*, zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,
  - *mobilní fáze B* - smíchá se 500 ml mobilní fáze A s 500 ml *acetonitrilu R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 až 30	48	52	izokraticky
30 až 44	48 až 20	52 až 80	lineární gradient
44 až 50	20	80	izokraticky

- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (d) a 20 µl porovnávacího roztoku (a). Zaznamená se chromatogram porovnávacího roztoku (d), dokud pík odpovídající hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je zřetelně viditelný. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími lidskému insulinu a prasečímu insulinu není menší než 1,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a) nebo, je-li třeba, porovnávacího roztoku (c) a 20 µl zkoušeného roztoku. Na chromatogramu porovnávacího roztoku se objeví desamidoinsulin jako malý pík za hlavním píkem a jeho relativní retenční čas vzhledem k hlavnímu píku je asi 1,3. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího desamidoinsulinu není větší než 3,0 % celkové plochy všech píků; součet ploch všech píků, kromě píku insulinu a desamidoinsulinu, není větší než 3,0 % celkové plochy všech píků.

Imunoreaktivita proinsulinu (PLI). Nejvýše 10 µg/g; počítáno na vysušenou látku. Imunoreaktivita proinsulinu se zkouší vhodnou imunochemickou metodou *(2.7.1)*, jako je radioimunoanalýza za použití mezinárodního referenčního prasečího nebo hovězího proinsulinu ke kalibraci metody.

Zinek. Nejvýše 1,0 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml. Je-li třeba, zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na koncentraci např. 0,4 µg Zn/ml až 1,6 µg Zn/ml.

Porovnávací roztoky. Připraví se roztoky obsahující 0,40 µg Zn/ml, 0,80 µg Zn/ml, 1,00 µg Zn/ml, 1,20 µg Zn/ml, 1,60 µg Zn/ml za použití čerstvě připraveného základního *roztoku zinku (5 mg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS*.

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen vhodného složení (např. 2 l acetylenu a 11 l vzduchu/min).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 0,200 g se suší 24 h při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 2,5 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 0,20 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 10 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml.

Zkoušený roztok (b). Ke 100 μl zkoušeného roztoku (a) se přidá 900 μl *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a dobře se promíchá.
Porovnávací roztok (a). Obsah lahvičky *prasečího insulinu CRL* nebo *hovězího insulinu CRL*, dle potřeby, se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí tak, aby výsledný roztok obsahoval 4,0 mg/ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg *lidského insulinu CRL* v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg *parsečího insulinu CRL* v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* se smíchají.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou jsou následující roztoky připravené a uchovávané při teplotě nepřevyšující 20 °C:
  - *mobilní fáze A* - 28,4 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml. Přidá se 2,7 ml *kyseliny fosforečné R*, a je-li třeba, upraví se pH na hodnotu 2,3 *ethanolaminem R*, zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,
  - *mobilní fáze B* - smíchá se 500 ml mobilní fáze A s 500 ml *acetonitrilu R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,
- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Zaznamenají se chromatogramy mobilní fáze obsahující směs objemových dílů mobilní fáze A a mobilní fáze B (48 + 52). V případě potřeby se upraví složení mobilní fáze.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b) a zaznamená se chromatogram. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími lidskému insulinu a prasečímu insulinu není menší než 1,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku je menší než 2 %.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku (a) a (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (a) stejného druhu insulinu jako zkoušená látka.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) je (10 ± 0,5)krát větší než plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b).

Vypočítá se obsah insulinu ($C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$ nebo $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$) za použití plochy píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a deklarovaného obsahu $C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$ v *prasečím insulinu CRL* nebo $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$ v *hovězím insulinu CRL*, jak je potřeba.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při -20 °C do uvolnění pro výrobu. Po rozpuštění se insulin uchovává při (5 ± 3) °C po krátkou dobu, než bude použit pro výrobu přípravku.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zvíře, z kterého byla látka získána,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

† Insulinum humanum

Lidský insulin

$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ M_r 5807,60 CAS 11061-68-0

Je to protein se strukturou antidiabetického hormonu produkovaného lidskou slinivkou břišní. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 105,0 % lidského insulinu $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$. 1 m.j. insulinu odpovídá 0,035 mg bezvodého insulinu.

Vyrábí se enzymatickou přeměnou a následujícím čištěním insulinu získaného z prasečí slinivky břišní nebo metodou založenou na rekombinantní DNK (rDNK) technologii. Lidský insulin vyráběný rDNK technologií odpovídá článku *Producta ab ADN recombinante.*

Výroba

Lidský insulin je vyráběn za podmínek minimalizujících mikrobiální znečištění.

Pro lidský insulin vyráběný enzymatickou přeměnou insulinu získaného z prasečí slinivky se ve validovaném výrobním procesu odstraňuje zbytková proteolytická účinnost. Oprávněná autorita může požadovat dodatečné zkoušky.

Pro lidský insulin vyráběný rDNK technologií lze vypustit následující zkoušku u každé šarže konečného výrobku, pokud oprávněná autorita neudělila výjimku.

Bílkoviny hostitelské buňky. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se postupem uvedeným v článku *Producta ab ADN recombinante.*

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu a v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a za rozkladu ve zředěných alkalických hydroxidech.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se shoduje s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Nečistoty s molekulovou hmotností větší než insulin, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Absorbance *(2.2.25)*. 5,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml. Specifická absorbance v maximu při 276 nm je 9,6 až 11,2, počítáno na vysušenou látku.

Nečistoty s molekulovou hmotností větší než insulin. Provede se vylučovací chromatografie *(2.2.30)*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 1,0 ml mobilní fáze.

Porovnávací roztok (a). 100 μl zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (b). Rozpustí se obsah lahvičky *lidského insulinu CRL* v mobilní fázi tak, aby výsledný roztok obsahoval 10 mg/ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,6 m a vnitřního průměru nejméně 7,5 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (10 µm; velikost pórů asi 13 nm),
- mobilní fáze, kterou je zfiltrovaná a odplyněná směs připravená takto: 20 objemových dílů *kyseliny octové ledové R* se smíchá s 50 objemovými díly *vody R*, upraví se pH na hodnotu 3,0 roztokem *amoniaku 17,5% RS* 25% (*V/V*), přidá se 30 objemových dílů *acetonitrilu R* a promíchá. Průtoková rychlost je 0,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 276 nm.

Nastříkne se odděleně po 50 µl každého roztoku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby velikost hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) byla 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků eluovaných před hlavním píkem není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %).

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 40,0 mg se rozpustí v 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS.*
Porovnávací roztok (a). Obsah lahvičky *lidského insulinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* tak, aby výsledný roztok obsahoval 4,0 mg/ml.
Porovnávací roztok (b). Obsah lahvičky *prasečího insulinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS.*
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (b).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou jsou následující roztoky připravené a uchovávané při teplotě nižší než 20 °C:
  - *mobilní fáze A* - 28,4 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml. Přidá se 2,7 ml *kyseliny fosforečné R*, a je-li třeba, upraví se pH na hodnotu 2,3 *ethanolaminem R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,
  - *mobilní fáze B* - smíchá se 500 ml mobilní fáze A s 500 ml *acetonitrilu R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 až 30	48	52	izokraticky
30 až 44	48 až 20	52 až 80	lineární gradient
44 až 50	20	80	izokraticky

- spektrofotometrického detektoru, 214 nm,

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (d) a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Zaznamenává se chromatogram porovnávacího roztoku (d), dokud pík odpovídající hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je zřetelně viditelný. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími lidskému insulinu a prasečímu insulinu není menší než 1,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a), 20 µl porovnávacího roztoku (c) a 20 µl zkoušeného roztoku. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je lidský desamidoinsulin jako malý pík za hlavním píkem a jeho relativní retenční čas vzhledem k hlavnímu píku je asi 1,3. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícímu lidskému desamidoinsulinu není větší než 2,0 % celkové plochy všech píků; součet ploch všech píků, kromě píku lidského insulinu a píku lidského desamidoinsulinu, není větší než 2,0 % celkové plochy všech píků; plocha žádného píku odpovídajícího hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Imunoreaktivita proinsulinu (PLI). Nejvýše 10 µg/g; počítáno na vysušenou látku. Imunoreaktivita proinsulinu se zkouší vhodnou imunochemickou metodou *(2.7.1)*, jako je radioimunoanalýza. Pro lidský insulin vyrobený enzymatickou přeměnou prasečího insulinu se použije mezinárodní referenční prasečí proinsulin ke kalibraci metody. Pro insulin vyrobený rDNK technologií se použije mezinárodní referenční lidský proinsulin.

Zinek. Nejvýše 1,0 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml. Je-li třeba, zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na vhodnou koncentraci (např. 0,4 µg až 1,6 µg Zn/ml).

Porovnávací roztoky. Připraví se roztoky obsahující 0,40 µg, 0,80 µg, 1,00 µg, 1,20 µg, 1,60 µg Zn/ml za použití čerstvě připraveného základního *roztoku zinku (5 mg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS.*

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen vhodného složení (např. 2 l acetylenu a 11 l vzduchu/min).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 0,200 g se suší 24 h při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 2,5 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 0,20 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 10 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10,0 ml.

Zkoušený roztok (b). Ke 100 µl zkoušeného roztoku (a) se přidá 900 µl *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a dobře se promíchá.

Porovnávací roztok (a). Obsah lahvičky *lidského insulinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí tak, aby výsledný roztok obsahoval 4,0 mg/ml.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) a 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg *prasečího insulinu CRL* v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* se smíchají.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou jsou následující roztoky připravené a uchovávané při teplotě nižší než 20 °C:
  - *mobilní fáze A* - 28,4 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml. Přidá se 2,7 ml *kyseliny fosforečné R*, a je-li třeba, upraví se pH na hodnotu 2,3 *ethanolaminem R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,
  - *mobilní fáze B* - smíchá se 500 ml mobilní fáze A s 500 ml *acetonitrilu R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *helia pro chromatografii R*,
- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Zaznamenají se chromatogramy mobilní fáze obsahující 48 objemových dílů mobilní fáze A a 52 objemových dílů mobilní fáze B. V případě potřeby se upraví složení mobilní fáze.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b) a zaznamená se chromatogram. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími lidskému insulinu a prasečímu insulinu není menší než 1,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku je menší než 2 %.

Nastříkne se po 10 µl zkoušeného roztoku (a) a (b) a 10 µl porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) je (10 ± 0,5)krát větší než plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b).

Vypočítá se obsah insulinu ($C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$) za použití plochy hlavního píku a plochy píku odpovídajícího desamidoinsulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a deklarovaného obsahu $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ v *lidském insulinu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při -20 °C do uvolnění pro výrobu. Po rozpuštění se insulin uchovává při (5 ± 3) °C po krátkou dobu, než bude použit pro výrobu přípravku.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda byla látka vyrobena enzymatickou přeměnou prasečího insulinu nebo rDNK technologií,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

† Interferoni alfa-2 solutio concentrata

Koncentrovaný roztok interferonu alfa-2

Je to roztok bílkoviny vytvořené podle informace kódované genem pro alfa-interferon, subtyp alfa-2, která vykazuje alespoň v homologních buňkách nespecifickou protivirovou účinnost v průběhu metabolických buněčných procesů syntézy ribonukleové kyseliny a bílkovin. Interferon alfa-2 vykazuje také antiproliferační účinnost. Různé typy interferonu alfa-2 se liší ve zbytku aminokyseliny v poloze 23 a označují se písmeny.

Označení	**Zbytek v poloze 23**
alfa-2a	Lys
alfa-2b	Arg

Tento článek se vztahuje na koncentrované roztoky interferonů alfa-2a a -2b.

Účinnost koncentrovaného roztoku interferonu alfa-2 je nejméně $1{,}4 \cdot 10^{8}$ m.j. v miligramu bílkoviny. Koncentrovaný roztok interferonu alfa-2 obsahuje nejméně $2 \cdot 10^{8}$ m.j. interferonu alfa-2 v mililitru.

Koncentrovaný roztok interferonu alfa-2 vyhovuje požadavkům článku *Producta ab ADN recombinante.*

Výroba

Vyrábí za podmínek minimalizujících mikrobiální znečištění přípravku.

Vyrábí se metodou založenou na rekombinantní DNK technologii za použití bakterií jako hostitelských buněk. Před uvolněním se na každé šarži konečné várky provedou následující zkoušky, pokud oprávněná autorita neudělila výjimku.

Bílkoviny odvozené z hostitelských buněk. Limity schvaluje oprávněná autorita.

DNK odvozená z hostitelských buněk nebo vektoru. Limity schvaluje oprávněná autorita.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá tekutina.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Stanovení účinnosti je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Hodnotí se elektroforeogramy ze zkoušky Izoelektrická fokusace, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní pás na elektroforeogramu zkoušeného roztoku odpovídá svojí polohou hlavnímu pásu na elektroforeogramu porovnávacího roztoku.

C. Hodnotí se elektroforeogramy ze zkoušky Nečistoty o odlišné molekulové hmotnosti, viz Zkoušky na čistotu, získané za redukujících podmínek. Hlavní pás na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá svojí polohou hlavnímu pásu na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Provede se peptidové mapování.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* na koncentraci bílkoviny 1,5 g/l. 25 µl se přenese do 1,5ml polypropylenové nebo skleněné zkumavky. Přidá se 1,6 µl *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 8,0 (1 mol/l),* 2,8 µl čerstvě připraveného roztoku *trypsinu pro peptidové mapování R* (1,0 g/l) ve *vodě R* a 3,6 µl *vody R* a silně se promíchá. Zkumavka se uzavře a nechá se 18 h ve vodní lázni při 37 °C, pak se přidá 100 µl roztoku *guanidiniumchloridu R* (573 g/l) a dobře se promíchá. Přidá se 7 µl roztoku *dithiothreitolu R* (154,2 g/l) a dobře se promíchá. Uzavřená zkumavka se na 1 min ponoří do vroucí *vody R*, pak se ochladí na pokojovou teplotu.
Porovnávací roztok. Připraví se současně stejným způsobem jako zkoušený roztok za použití roztoku příslušného *interferonu alfa-2 CRL* (1,5 g/l) ve *vodě R.*

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) s širokými póry,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, kterou jsou následující roztoky:
  - *mobilní fáze A* - 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* se zředí *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* - ke 100 ml *vody R* se přidá 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* a zředí se *acetonitrilem pro chromatografii R* na 1000 ml,

Gradientový program:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
	100	0	ustalování
0 → 8	100	0	izokraticky
8 → 68	100 → 40	0 → 60	lineární gradient
68 → 72	40	60	izokraticky
72 → 75	40 → 100	60 → 0	lineární gradient
75 → 80	100	0	znovuustalování

- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Teplota kolony se udržuje na 30 °C.

Kolona se promývá nejméně 15 min mobilní fází A do ustálení rovnováhy. Nastříkne se odděleně po 100 µl každého roztoku. Chromatogram zkoušeného roztoku odpovídá chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogram každého roztoku je kvalitativně podobný chromatogramu příslušného referenčního *interferonu alfa-2 CRL.*

Zkoušky na čistotu

Bílkoviny.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* na roztok obsahující asi 0,5 mg/ml interferonu alfa-2.
Porovnávací roztok. Připraví se zásobní roztok *albuminu hovězího R* (0,5 mg/ml) ve *vodě R.* Ředěním zásobního roztoku se připraví osm roztoků obsahujících 3 µg/ml až 30 µg/ml *albuminu hovězího R.*

Zkoušený roztok se zředí třicetkrát a padesátkrát. Přidá se 1,25 ml roztoku připraveného téhož dne smícháním 2,0 ml roztoku *síranu měďnatého R* (20 g/l) ve *vodě R,* 2,0 ml roztoku *vínanu*

sodného R (40 g/l) ve *vodě R* a 96,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (40 g/l) v *hydroxidu sodném 0,2 mol/l RS* do zkumavek obsahujících 1,5 ml *vody R* (slepá zkouška), 1,5 ml různých zředění zkoušeného roztoku nebo 1,5 ml porovnávacích roztoků. Po každém přídavku se promíchá. Asi po 10 min se do každé zkumavky přidá 0,25 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* připraveného téhož dne a promíchá se. Asi po 30 min se změří absorbance (*2.2.25*) každého roztoku při 750 nm proti kontrolnímu roztoku získanému při slepé zkoušce. Sestrojí se kalibrační křivka závislosti absorbance osmi porovnávacích roztoků na obsahu bílkovin a z křivky se odečte obsah bílkovin ve zkoušeném roztoku.

Nečistoty o odlišné molekulové hmotnosti. Provede se polyakrylamidová gelová elektroforéza (*2.2.31*) za redukujících i neredukujících podmínek.

Separační gel. 9,08 g *trometamolu R*, 0,2 g *laurylsíranu sodného R* a 14 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* se rozpustí ve *vodě R*, je-li třeba, pH se upraví na hodnotu 8,8 a roztok se zředí *vodou R* na 100 ml (roztok A). 8,22 g *akrylamidu R* a 0,22 g *methylenbisakrylamidu R* se rozpustí ve 30 ml *vody R* a zředí se roztokem A na 60 ml. Roztok se zfiltruje, odplyní a přidá se 0,015 ml *tetramethylethylendiaminu R* a 0,075 ml roztoku *peroxodisíranu diamonného R* (100 g/l).
Zaostřovací gel. 3,03 g *trometamolu R*, 0,2 g *laurylsíranu sodného R* a 21 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* se rozpustí ve *vodě R,* je-li třeba, pH se upraví na hodnotu 6,8 a zředí se *vodou R* na 100 ml (roztok B). 1,0 g *akrylamidu R* a 0,026 g *methylenbisakrylamidu R* se rozpustí v 10 ml *vody R* a zředí se roztokem B na 20 ml. Roztok se zfiltruje, odplyní a přidá se 0,010 ml *tetramethylethylendiaminu R* a 0,1 ml roztoku *peroxodisíranu diamonného R* (100 g/l). Během polymerizace zaostřovacího gelu se použije vhodný teflonový hřeben, aby se vytvořily jamky pro vzorky.
Elektrodový tlumivý roztok. 24,0 g *trometamolu R*, 115,2 g *glycinu R* a 4,0 g *laurylsíranu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 4000 ml. Je-li třeba, pH se upraví na hodnotu 8,3.
Vzorkový tlumivý roztok. Pro redukující podmínky: 0,75 g *trometamolu R*, 10 ml *glycerolu R*, 1 g *laurylsíranu sodného R*, 1 ml *2-merkaptoethanolu R* a 1 mg *modři bromfenolové R* se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml. Je-li třeba, pH se upraví na hodnotu 6,8. Pro neredukující podmínky se vynechá 2-merkaptoethanol.
Zkoušený roztok (a). Zkoušený přípravek se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na koncentraci bílkoviny 0,5 g/l.
Zkoušený roztok (b). 0,20 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na 1 ml.
Porovnávací roztok (a). Roztok vhodného *interferonu alfa-2 CRL* se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na koncentraci 0,625 g/l.
Porovnávací roztok (b). 0,20 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na 1 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,20 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na 1 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,20 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na 1 ml.
Porovnávací roztok (e). 0,20 ml porovnávacího roztoku (d) se zředí vzorkovým tlumivým roztokem na 1 ml.

Zkoušené a porovnávací roztoky v uzavřených zkumavkách se umístí na 2 min do vroucí vodní lázně. Do jamek zaostřovacího gelu se nanese odděleně po 50 μl každého zkoušeného roztoku a po 10 μl standardního roztoku molekulových hmotností. Spustí se elektroforéza při proudu 10 mA na gel. Když čelo zóny barviva dosáhne separačního gelu, přepne se na 20 mA na gel, přístroj se ochlazuje cirkulující vodou o teplotě 10 °C. Gel se ponoří na 16 h do směsi objemových dílů

kyseliny octové R, *vody R* a *methanolu R* (10 + 40 + 50). Gel se přenese do roztoku *glutaraldehydu R* (100 g/l) ve *vodě R* a třepe se asi 30 min. Pak se roztok glutaraldehydu na 20 min nahradí *vodou destilovanou R*. Promývání se dvakrát opakuje. Gel se přenese do směsi obsahující 0,8 g/l *hydroxidu sodného R*, roztok *amoniaku 32% R* 4% (*V/V*) a 8 g/l *dusičnanu stříbrného R*. Tento roztok se připravuje těsně před použitím. Třepe se 5 min ve tmě. Gel se promývá třikrát 30 s *vodou R* a pak se třepe ve směsi obsahující 0,05 g/l *kyseliny citronové R*, *formaldehyd RS* 0,14% (*V/V*) a *methanol R* 0,005% (*V/V*) ve *vodě R*, přičemž se objeví pásy bílkovin. Gel se ponechá v roztoku tak dlouho, dokud se dostatečně neobarví, a pak se opakovaně promyje *vodou R*. Pak se gel ponoří na 2 h až 3 h do roztoku *glycerolu R* 20% (*V/V*) ve *vodě R*.

Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) za redukujících podmínek mohou, kromě hlavního pásu, být méně intenzivní pásy s nižšími molekulovými hmotnostmi než hlavní pás; žádný takový pás není intenzivnější než hlavní pás na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %) a nejvýše tři takové pásy jsou intenzivnější než hlavní pás na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (e) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže bílkoviny standardu molekulových hmotností jsou distribuovány na 80 % délky gelu, jestliže na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (e) je viditelný pás a na elektroforeogramech zkoušených roztoků (a) a (b) a porovnávacích roztoků (a) a (e) je viditelný nárůst intenzity barvení.

Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) za neredukujících podmínek mohou být, kromě hlavního pásu, méně intenzivní pásy s vyšší molekulovou hmotností než hlavní pás. Žádný takový pás není intenzivnější než hlavní pás na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (d) (1,0 %) a nejvýše tři takové pásy jsou intenzivnější než hlavní pás na elektroforeogramu porovnávacího roztoku (e) (0,2 %).

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* na koncentraci bílkoviny 1 g/l.
Porovnávací roztok (a). Připraví se roztok vhodného *interferonu alfa-2 CRL* (1 g/l) ve *vodě R*.
Porovnávací roztok (b). Porovnávací roztok (a) se zředí *peroxidem vodíku zředěným RS* na konečnou koncentraci 50 mg/l. Nechá se 60 min stát, pak se přidá 12,5 mg *methioninu R* na mililitr roztoku a nechá se 60 min stát.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) s širokými póry,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, kterou jsou následující směsi:
  - *mobilní fáze A* - k 700 ml *vody R* se přidají 2 ml *kyseliny trifluoroctové R* a zředí se *acetonitrilem pro chromatografii R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* - ke 200 ml *vody R* se přidají 2 ml *kyseliny trifluoroctové R* a zředí se *acetonitrilem pro chromatografii R* na 1000 ml,

Gradientový program:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
	72	28	ustalování
0 → 1	72	28	izokraticky
1 → 5	72 → 67	28 → 33	lineární gradient
5 → 20	67 → 63	33 → 37	lineární gradient
20 → 30	63 → 57	37 → 43	lineární gradient
30 → 40	57 → 40	43 → 60	lineární gradient
40 → 42	40	60	izokraticky
42 → 50	40 → 72	60 → 28	lineární gradient
50 → 60	72	28	znovuustalování

- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Teplota kolony se udržuje na 35 °C.

Kolona se promývá nejméně 15 min mobilní fází o počátečním složení do ustavení rovnováhy. Nastřikuje se po 10 µl každého roztoku.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku retenční čas hlavního píku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je patrný pík oxidovaného interferonu, jehož retenční čas je nepatrně kratší než retenční čas hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže oba píky se dělí již na základní linii. Přihlíží se pouze k píkům, jejichž relativní retenční časy vzhledem ke hlavnímu píku jsou 0,7 až 1,4. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než 3,0 % celkové plochy všech píků. Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 5,0 % celkové plochy všech píků.

Izoelektrická fokusace.

Provede se izoelektrická fokusace.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* na koncentraci bílkoviny 1 g/l.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok vhodného *interferonu alfa-2 CRL* (1 g/l) ve *vodě R*.
Kalibrační roztok izoelektrických bodů v oblasti pH 3,0 až 10,0. Připraví a použije se podle návodu výrobce.

Použije se vhodný přístroj spojený s recirkulační vodní lázní s kontrolovanou teplotou při 10 °C a gely pro izoelektrickou fokusaci s gradientem pH 3,5 až 9,5. S přístrojem se pracuje podle návodu výrobce. Jako anodový roztok se použije *kyselina fosforečná 1 mol/l RS* a jako katodový roztok *hydroxid sodný 1 mol/l RS*. Vzorky se nanášejí na gel filtračními papírky. Filtrační papírky pro nanášení vzorku se umístí na gel u katody. Nanáší se odděleně 15 µl zkoušeného roztoku a 15 µl porovnávacího roztoku. Spustí se izoelektrická fokusace při 1500 V a 50 mA. Po 30 min se vypne proud, odstraní se filtrační papírky a znovu se připojí zdroj napětí na 1 h. Během fokusačního procesu se udržuje konstantní napětí. Po fokusaci se gel ponoří do vhodného objemu roztoku *kyseliny trichloroctové R* (115 g/l) a *kyseliny sulfosalicylové R* (34,5 g/l) ve *vodě R* a nádobou se 60 min opatrně třepe. Gel se přenese do směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethanolu R* a *vody R* (32 + 100 + 268) a promývá se 5 min. Pak se gel na 10 min ponoří do barvicího roztoku *modři brilantní R* (1,2 g/l) ve stejné směsi kyseliny octové ledové, ethanolu a vody předehřátého na 60 °C. Gel se promyje v několika nádobách stejnou směsí kyseliny octové ledové, ethanolu a vody a v této směsi se ponechá, dokud není pozadí bezbarvé (12 h až 24 h). Po

odpovídajícím odbarvení se gel ponoří na 1 h do roztoku *glycerolu R* 10% (*V/V*) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethanolu R* a *vody R* (32 + 100 + 268).

Hlavní pás na elektroforeogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou hlavnímu pásu na elektroforeogramu porovnávacího roztoku. Do grafu se vynese závislost migračních vzdáleností ukazatelů izoelektrických bodů na jejich izoelektrických bodech a určí se izoelektrický bod hlavních složek zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku; neliší se o více než 0,2 hodnoty pH. Zkoušku lze hodnotit, jestliže ukazatele izoelektrických bodů jsou distribuovány po celé délce gelu a izoelektrický bod porovnávacího roztoku leží mezi 5,8 a 6,3.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 100 m.j. endotoxinu v objemu, který obsahuje 1,0 mg bílkoviny.

Stanovení účinnosti

Účinnost interferonu alfa-2 se stanoví porovnáním jeho ochranného působení proti virovému cytopatickému účinku s působením vhodného mezinárodního standardu lidského rekombinantního interferonu alfa-2 nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách. Mezinárodní jednotka je účinnost deklarovaného množství vhodného mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnické organizace.

Zkouška se provádí vhodnou metodou založenou na následujícím uspořádání.

Použije se stanovená buněčná kultura citlivá na cytopatické působení vhodného viru (vhodná je buněčná linie lidských diploidních fibroblastů prostá mikrobiální kontaminace a citlivá na interferon, která je citlivá na virus encefalomyokarditidy) za standardních kultivačních podmínek.

Vhodné jsou následující buněčné kultury a viry: buňky MDBK (ATCC č. CCL22) nebo myší L-buňky (NCTC klon 929; ATCC č. CCL 1) jako buněčná kultura a virus vezikulární stomatitidy VSV, kmen Indiana (ATCC č VR-158) jako infekční agens. Lze použít také buňky lidských diploidních fibroblastů FS-71 odpovídající na působení interferonu jako buněčná kultura a virus encefalomyokarditidy (ATCC č. VR-129B) jako infekční agens.

Použijí se tři nebo více různých zředění zkoušeného přípravku a porovnávacího přípravku v nejméně čtyřech souběžných stanoveních na mikrotitračních destičkách. Každé stanovení obsahuje kontrolní buňky, které nejsou vystaveny působení interferonu. Zvolí se taková ředění přípravku, kde nejnižší ředění již poskytuje ochranu a nejvyšší koncentrace poskytuje menší než maximální ochranu proti cytopatickému účinku viru. Ve vhodném čase se přidá cytopatický virus do všech jamek s výjimkou dostatečného počtu jamek v každém souběžném stanovení s neinfikovanými kontrolními buňkami. Cytopatický účinek viru se určí kvantitativně vhodnou metodou. Účinnost zkoušeného přípravku se vypočítá obvyklými statistickými metodami pro model rovnoběžnosti.

Stanovená účinnost je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti stanovené účinnosti (P = 0,95) je 64 % až 156 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nižší než -20 °C.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- druh interferonu (alfa-2a nebo alfa-2b),
- způsob výroby.

† Iodum

Jod

I_2 M_r 253,81 CAS 7553-56-2

Obsahuje 99,5 % až 100,5 % I.

Vlastnosti

Šedofialové křehké destičky nebo malé krystaly s kovovým leskem. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v glycerolu, velmi snadno rozpustný v koncentrovaných roztocích jodidů. Jod sublimuje již za pokojové teploty.

Zkoušky totožnosti

A. Několik částic zkoušené látky se zahřívá ve zkumavce; vznikají fialové páry, které sublimují za vzniku modravě černého krystalického sublimátu.

B. K nasycenému roztoku se přidá *škrob RS;* vznikne modré zbarvení, které zahřátím mizí. Po ochlazení se zbarvení opět objeví.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 3,0 g se rozetřou s 20 ml *vody R*, směs se zfiltruje, filtr se promyje a filtrát se zředí *vodou R* na 30 ml. K filtrátu se přidá 1 g *zinku práškového R*. Po odbarvení se směs zfiltruje, filtr se promyje *vodou R* a filtrát se zředí *vodou R* na 40 ml.

Bromidy a chloridy. K 10 ml roztoku S se přidají 3 ml *amoniaku 17,5% RS* a 6 ml *dusičnanu stříbrného RS2.* Směs se zfiltruje, filtr se promyje *vodou R* a filtrát se zředí *vodou R* na 20 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 1,5 ml *kyseliny dusičné R;* po 1 min roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně smícháním 10,75 ml *vody R*, 0,25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS*, 0,2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 0,3 ml *dusičnanu stříbrného RS2* (250 μg/g).

Netěkavé látky. 1,00 g se zahřívá v porcelánové misce na vodní lázni do odpaření jodu. Zbytek sušený při 100 °C až 105 °C váží nejvýše 1 mg (0,1 %).

Stanovení obsahu

0,200 g se přenese do baňky obsahující 1 g *jodidu draselného R* a 2 ml *vody R* a přidá se 1 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Po úplném rozpuštění zkoušené látky se přidá 50 ml *vody R* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,69 mg I.

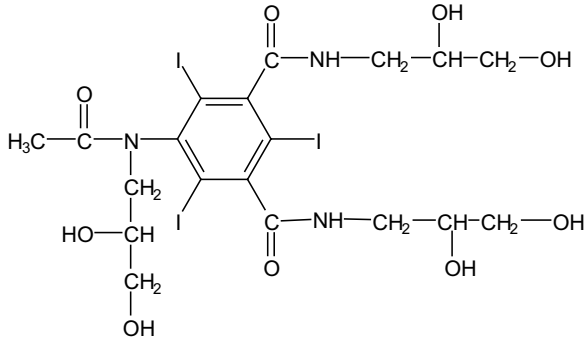
Uchovávání

Ve skleněných obalech se zabroušenou zátkou.

Separandum.

† Iohexolum

Johexol



$C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$ M_r 821,14 CAS 66108-95-04

Je to 5-[N-(2,3-dihydroxypropylacetamido)]-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-trijodbenzen--1,3-dikarboxamid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$.

Vlastnosti

Bílý nebo šedobílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu. Látka je směsí diastereoizomerů a atropizomerů.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *iohexolu CRL*. Tablety se připraví za použití *bromidu draselného R*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky A, viz Zkoušky na čistotu. Retenční časy a velikosti hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou přibližně stejné jako píků odpovídajících johexolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky.

A. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).
(Vzhledem k endo-exoizomerii jsou na chromatogramu dva nerozdělené píky johexolu. Kromě toho se na počátku prvního hlavního píku obvykle objevuje malý pík náležící rovněž johexolu. Retenční čas tohoto malého píku je asi o 1,2 min menší než retenční čas prvního hlavního píku).

Zkoušený roztok. 0,150 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15,0 mg *johexolu CRL* a 15,0 mg *johexolu nečistoty A CRL* se rozpustí ve směsi jedné až dvou kapek *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné vhodným *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 99) na počátku eluce a (13 + 87) na konci eluce, při průtokové rychlosti 1 ml/min a lineární gradientové eluci 60 min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Kolona se promývá mobilní fází o počátečním složení do ustavení rovnováhy po dobu nejméně 10 min.

Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku po nástřiku 10 μl porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Odděleně se nastříkne 10 μl *vody R* jako kontrolního roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: johexolu nečistoty A asi 17 min a obou píků johexolu (odpovídajích *endo/exo*izomerním formám) asi 20 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím johexolu nečistotě A a druhým větším píkem odpovídajícím johexolu je nejméně 5. V případě potřeby se upraví koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo se upraví program lineární gradientové eluce.

Odděleně se nastříkne po 10 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě píků náležejících johexolu (viz výše), větší než polovina plochy hlavních píků johexolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavních píků johexolu (viz výše), není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k žádnému píku odpovídajícímu kontrolnímu roztoku.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *johexolu nečistoty J CRL* a 50 mg *johexolu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Vrstva se promyje mobilní fází, která je směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methanolu R, 2-propanolu R* a *acetonu R* (20 + 20 + 35 + 50), suší se 30 min při pokojové teplotě a pak 1 h při 90 °C.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se výše uvedenou směsí po dráze 10 cm. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

3-Chlorpropan-1,2-diol. Nejvýše 100 μg/g. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve 2,0 ml *vody R*. Tento roztok se postupně čtyřikrát protřepe vždy 2 ml *methylacetatu R*. Spojené horní vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a zahustí na 2 ml.

Porovnávací roztok. 0,50 g *3-chlorpropan-1,2-diolu R* se rozpustí v *methylacetatu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- křemenné kolony délky 25 m a vnitřního průměru 0,33 mm potažené *polymethylfenylsiloxanem R* o síle filmu 1 μm,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 2 min na 80 °C, pak se zvyšuje rychlostí 15 °C/min až na 170 °C, při níž se udržuje 2 min. Teplota nástřikového prostoru je 230 °C a detektoru 250 °C.

Odděleně se nastříkne po 2 μl každého roztoku (bez děliče nástřiku 30 s). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek je retenční čas 3-chlorpropan-1,2-diolu asi 8 min. Vypočte se obsah 3-chlorpropan-1,2-diolu.

Methanol, methoxyethanol a 2-propanol. Nejvýše 50 μg/g methanolu a nejvýše po 100 μg/g methoxyethanolu a 2-propanolu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) head-space metodou a metodou standardního přídavku za použití *2-butanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,50 g *2-butanolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Zkoušený roztok (a). 6,25 g se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 5,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.

Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a 1 ml *vody R* se převedou do 10ml lahvičky a lahvička se ihned uzavře.

Zkoušený roztok (c). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se převedou do 10ml lahvičky a lahvička se ihned uzavře (odpovídá standardnímu přídavku 10 μg *methanolu R*, 20 μg *2-propanolu R* a 20 μg *methoxyethanolu R*).

Zkoušený roztok (d). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se převedou do 10ml lahvičky a lahvička se ihned uzavře (odpovídá standardnímu přídavku 25 μg *methanolu R*, 50 μg *2-propanolu R* a 50 μg *methoxyethanolu R*).

Zkoušený roztok (e). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a 1,0 ml porovnávacího roztoku (d) se převedou do 10ml lahvičky a lahvička se ihned uzavře (odpovídá standardnímu přídavku 50 μg *methanolu R*, 100 μg *2-propanolu R* a 100 μg *methoxyethanolu R*).

Porovnávací roztok (a). 0,625 g *methanolu R*, 1,250 g *2-propanolu R* a 1,250 g *methoxyethanolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Mezi přídavky jednotlivých složek se vždy směs přiměřeně naředí *vodou R*.

Porovnávací roztok (b). 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (e). 10,0 ml porovnávacího roztoku (d) se přidá k 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 6,0 ml tohoto roztoku se převede do 10ml lahvičky a lahvička se ihned uzavře.

Postup head-space metodou se obvykle provádí za podmínek:
- teploty 95 °C v komoře s řízenou teplotou,
- doby rovnováhy 15 min,
- teploty převodníku 140 °C,
- doby tlakování 30 s,
- doby plnění smyčky 10 s,
- doby nástřiku 10 s.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,54 mm potažené zesítěným *poly(kyanopropyl)(methylfenylmethyl)siloxanem R* o síle filmu 3 μm,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti asi 14 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 40 °C, pak se zvyšuje rychlostí 10 °C/min na 100 °C, při níž se udržuje 1 min. Teplota nástřikového prostoru je 140 °C a teplota detektoru 250 °C.

Zaznamenají se chromatogramy zkoušených roztoků (b), (c), (d) a (e) a porovnávacího roztoku (e). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy: methanolu asi 1,2 min, 2-propanolu asi 1,8 min, 2-butanolu asi 3,5 min a methoxyethanolu asi 4,5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky methanolu a 2-propanolu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) je nejméně 2,5. Z chromatogramů zkoušených roztoků se vypočte poměr plochy píku k ploše píku vnitřního standardu pro každou stanovovanou látku, zjištěné hodnoty se zpracují lineární regresní analýzou a vypočtou se koncentrace stanovovaných složek ve zkoušené látce.

Střídavě se poměry ploch píků vynesou proti přidanému množství dané stanovované látky k 1 g zkoušené látky. Křivka spojující jednotlivé body se extrapoluje až k průsečíku s osou koncentrace. Délka mezi tímto průsečíkem a průsečíkem obou os je hledanou koncentrací stanovované látky ve zkoušené látce (v μg/g).

Volné aromatické aminy. Nejvýše 0,05 %; Stanoví se absorpční spektrofotometrií (*2.2.25*).

Zkoušený roztok. 0,200 g se v 25ml odměrné baňce rozpustí v 15,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. 10,0 ml roztoku obsahujícího 10 μg/ml *johexolu nečistoty J CRL* se převede do 25ml odměrné baňky, přidá se 5,0 ml *vody R* a promíchá se.
Kontrolní roztok. 15,0 ml *vody R* se převede do 25ml odměrné baňky.

(V průběhu dalšího postupu jsou baňky umístěny v ledové vodě a pracuje se za ochrany před světlem až do okamžiku, kdy jsou přidána všechna zkoumadla).

Baňky obsahující zkoušený roztok, porovnávací roztok a kontrolní roztok se umístí do ledové vody a ponechají se za ochrany před světlem 5 min. Pak se přidá po 1,5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1*, promíchá se, přidá se po 1,0 ml roztoku *dusitanu sodného R* (20 g/l), promíchá se a nechá stát 4 min. Přidá se po 1,0 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (40 g/l) a mírně se promíchává až do ukončení vývinu plynů a nechá stát 1 min. *(Upozornění: v baňkách vzniká přetlak)*. Pak se přidá 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (3 g/l) ve směsi objemových dílů *vody R* a *propylenglykolu R* (30 + 70) a promíchá se. Baňky se vyjmou z ledové vody, zředí se *vodou R* na 25 ml, promíchá se a nechá se stát 5 min. Absorbance zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku se změří souběžně při vlnové délce 495 nm v tloušťce vrstvy 50 mm proti kontrolnímu roztoku a z naměřených hodnot se vypočte obsah volných aromatických aminů.

Jodidy. Nejvýše 20 μg/g. Provede se potenciometrická titrace (*2.2.20*). 6,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Přidají se 2,0 ml *jodidu draselného 0,001 mol/l VS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,001 mol/l VS* za použití stříbrné elektrody jako indikační a vhodné referenční elektrody.

Provede se slepá zkouška; 2,0 ml *jodidu draselného 0,001 mol/l VS* se zředí *vodou R* na 20 ml. Z rozdílu spotřeb se vypočte obsah jodidů.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,001 mol/l VS* odpovídá 126,9 μg jodidu.

Iontové sloučeniny. Nejvýše 0,05 %, počítáno jako chlorid sodný. Provede se stanovení měrné vodivosti (*2.2.38*). *Veškeré potřebné laboratorní sklo se před použitím pětkrát promyje vodou destilovanou R.*

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok. 10,0 mg *chloridu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Na vhodném konduktometru se změří měrná vodivost zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Měrná vodivost zkoušeného roztoku není větší než měrná vodivost porovnávacího roztoku.

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se v 250ml baňce s kulovitým dnem smíchá s 25 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 20 ml *vody R*, 1 g *zinku práškového R* a přidá se několik skleněných varných kuliček. Vaří se pod zpětným chladičem 30 min. Pak se nechá vychladnout a chladič se promyje 20 ml *vody R,* které se přidají do baňky. Obsah baňky se zfiltruje, filtr se promyje několika podíly *vody R*, které se spojí s filtrátem. Přidá se 5 ml *kyseliny octové ledové R* a ihned se titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence. Vhodným elektrodovým systémem je použití stříbrné a merkurosulfatové elektrody.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,37 mg $C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.
Separandum.

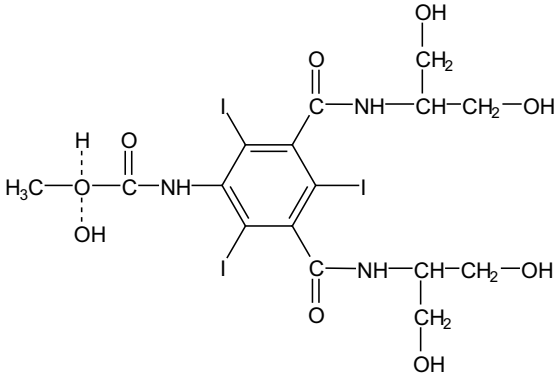
Nečistoty

A. 5-acetamido-N,N′-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-trijodbenzen-1,3-dikarboxamid,
B. N,N′-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-trijod-5-[N-(2,6,7-trihydroxy-4-oxaheptyl)acetamido]benzen--1,3-dikarboxamid,
C. 5-[N-(5,6-dihydroxy-2-hydroxymethyl-3-oxahexyl)acetamido]-N,N′-bis(2,3-dihydroxypropyl)--2,4,6-trijodbenzen-1,3-dikarboxamid,
D. N-(2,3-dihydroxypropyl)-5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)acetamido]-2,4,6-trijod-N′-(2,6,7-trihydroxy--4-oxaheptyl)benzen-1,3-dikarboxamid,
E. N-(5,6-dihydroxy-2-hydroxymethyl-3-oxahexyl)-N′-(2,3-dihydroxypropyl)-5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)acetamido]-2,4,6-trijodbenzen-1,3-dikarboxamid,
F. 5-amino-N,N′-bis(2,3-dihydroxypropyl)dijodbenzen-1,3-dikarboxamid,

G. 5-acetamido-N,N -bis(2,3-dihydroxypropyl)dijodbenzen-1,3-dikarboxamid,
H. N,N -bis(2,3-dihydroxypropyl)-5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)acetamido]dijodbenzen-1,3-dikarboxamid,
I. 6,8-bis(2,3-dihydroxypropylkarbamoyl)-3,4-dihydro-2-hydroxymethyl-5,7-dijod-4*H*-1,4-benzoxazin,
J. 5-amino-N,N -bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-trijodbenzen-1,3-dikarboxamid.

† Iopamidolum

Jopamidol



$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$ M_r 777,09 CAS 60166-93-0

Je to (S)-N,N -bis [2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-(2-hydroxypropionamido)-2,4,6-trijod--benzen-1,3-dikarboxamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v lihu 96 % a dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *jopamidolu CRL.*

B. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 10 g se rozpustí *ve vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml. K dosažení hodnoty pH 7,0 (*2.2.3*) se spotřebuje nejvýše 0,75 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 1,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -4,6° až -5,2°, počítáno na vysušenou látku. 10,0 g se rozpustí ve *vodě R*, je-li zapotřebí za zahřátí, a zředí se jí na 25,0 ml. Otáčivost tohoto roztoku se měří při 436 nm.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *jopamidolu nečistoty B CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 5 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí *vody R* (mobilní fáze A) a roztoku *methanolu R* 25% (*V/V*) (mobilní fáze B) s gradientovou elucí podle níže uvedené tabulky:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0	92,5	7,5
6	92,5	7,5
18	65	35
30	8	92
34	8	92
36	92,5	7,5

- průtokové rychlosti 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 240 nm.

Teplota kolony se udržuje na 35 °C.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky obou píků na chromatogramu nebyly menší než 50 % celého rozsahu stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaném chromatogramu rozlišení mezi píkem jopamidolu nečistoty B a jopamidolu není menší než 5.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, větší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %). Nepřihlíží se k píku, jehož plocha je menší než 0,02násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Volné aromatické aminy. *V průběhu zkoušky jsou roztoky a zkoumadla umístěny v ledové vodě, pracuje se za ochrany před světlem.*

Zkoušený roztok. 0,500 g se v 25ml odměrné baňce rozpustí v 20,0 ml *vody R.*
Porovnávací roztok. 4,0 ml roztoku *jopamidolu nečistoty A CRL* (25,0 mg/l) se smíchá ve 25ml odměrné baňce se 16,0 ml *vody R.*
Kontrolní roztok. 20,0 ml *vody R* se převede do 25ml odměrné baňky.

Všechny tři baňky se umístí do ledové vody a ponechají se 5 min za ochrany před světlem. Pak se přidá po 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, obsahy se promíchají a ponechá se stát 5 min. Přidá se po 1,0 ml roztoku *dusitanu sodného R* (20 g/l) připraveného těsně před použitím, promíchá se a opět se ponechá stát 5 min. Přidá se po 1,0 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (120 g/l), mírně se promíchává, dokud unikají plyny. *(Upozornění: v baňkách vzniká přetlak)*. Po 5 min se přidá po 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l) a promíchá se. Baňky se vyjmou z ledové vody a nechají se stát 10 min. Pak se obsahy zředí *vodou R* na 25,0 ml, promíchá se a ihned se měří absorbance (*2.2.25*) zkoušeného a porovnávacího roztoku proti kontrolnímu roztoku při 500 nm. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (200 μg/ml).

Volný jod. Do kyvety pro odstřeďování opatřené zátkou se naváží 2,0 g a rozpustí se v 25 ml *vody R*. Přidá se 5 ml *toluenu R* a 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Obsah se protřepe a pak odstředí. V horní vrstvě nevznikne červené zbarvení.

Jodidy. Nejvýše 10 μg/ml. Provede se potenciometrická titrace (*2.2.20*). 6,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Přidají se 2,0 ml *jodidu draselného 0,001 mol/l VS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,001 mol/l VS* za použití stříbrné elektrody jako indikační a vhodné referenční elektrody. Provede se slepá zkouška. Kontrolní roztok se připraví z 20 ml *vody R* a 2,0 ml *jodidu draselného 0,001 mol/l VS*. Z rozdílu spotřeb se vypočte obsah jodidů.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,001 mol/l VS* odpovídá 126,9 μg jodidu.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*).Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1,4 m.j. endotoxinu v gramu.

Stanovení obsahu

0,300 g v 250ml baňce s kulatým dnem se smíchá s 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS,* 20 ml *vody R*, 1 g *zinku práškovaného R* a přidá se několik skleněných varných kuliček. Vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Pak se nechá vychladnout, chladič se promyje 20 ml *vody R* a promývací kapalina se přidá do baňky.

Obsah se zfiltruje a filtr se promyje několika podíly *vody R*. Filtrát se spojí s promývací tekutinou, přidá se 5 ml *kyseliny octové ledové R* a ihned se titruje *dusičnanenm stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence a za použití vhodného elektrodového systému, jakým je stříbrná a merkurosulfatová elektroda.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,90 mg $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$.

Uchovávání

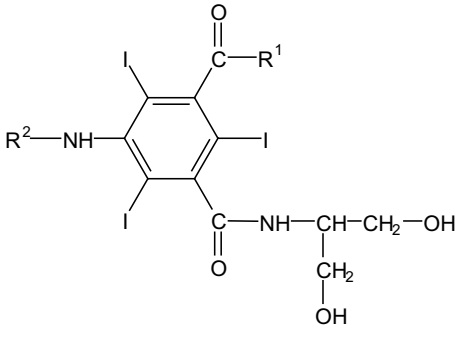
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obale se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty



A. $R^1 = NHCH(CH_2OH)_2$; $R^2 = H$: N,N′-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-amino-2,4,6-trijodisoftalamid,

B. $R^1 = NHCH(CH_2OH)_2$; $R^2 = COCH_2OH$: N,N′-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-(2-hydroxyacetamido)-2,4,6-trijodisoftalamid,

C. $R^1 = NHCH(CH_2OH)_2$; $R^2 = COCH_3$: N,N′-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-acetamido--2,4,6-trijodisoftalamid,

D. $R^1 = OH$; $R^2 = COCHOHCH_3$: kyselina N-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-(2-hydroxypropionamido)-2,4,6-trijodisoftalamová,

E. $R^1 = NHCH(CH_2OH)_2$; $R^2 = COCH(CH_3)OCOCH_3$: N,N′-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)--ethyl]-5-(2-acetoxypropionamido)-2,4,6-trijodisoftalamid,

F. $R^1 = N(CH_3)_2$; $R^2 = COCHOHCH_3$: N-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-N′-dimethyl-5-(2--hydroxypropionamido)-2,4,6-trijodisoftalamid,

G. $R^1 = NHCH_2$-CHOH-CH_2OH; $R^2 = COCHOHCH_3$: N-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-N′--(2,3-dihydroxypropyl-5-(2-hydroxypropionamido)-2,4,6-trijodisoftalamid.

† Ipecacuanhae radix

Hlavěnkový kořen

Synonymum. Radix ipecacuanhae, ipekakuanhový kořen

Jsou to usušené úlomky kořene a oddenku druhu *Cephaelis ipecacuanha* (BROT.) A. RICH., známého jako Matto Grosso ipecacuanha, nebo druhu *Cephaelis acuminata* KARSTEN, známého jako Costa Rica ipecacuanha, nebo směs obou druhů. Obsahuje nejméně 2,0 % alkaloidů, počítáno jako emetin ($C_{29}H_{40}N_2O_4$; M_r 480,7), vztaženo na vysušenou drogu.

Hlavními alkaloidy jsou emetin a cefaëlin.

Vlastnosti

Droga slabého pachu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. *C. ipecacuanha*. Kořen zpravidla tvoří zkroucené úlomky, tmavě červenohnědé až silně tmavohnědé, zřídka více než 15 cm dlouhé nebo 6 mm silné, zevně hustě prstencovitě zaškrcované. Lom je v kůře krátký, ve dřevě třištivý. Na příčném řezu je patrna široká našedlá kůra a úzká homogenní hustá vrstva dřeva. Oddenek je zpravidla kratší, většinou spojený s kořeny. Je válcovitý, až 2 mm v průměru, jemně podélně vrásčitý s dření, která zaujímá asi jednu šestinu průměru.

C. acuminata. Kořen podobný jako u *C. ipecacuanha*, liší se však v následujících znacích: je často až 9 mm silný, na povrchu šedohnědý nebo červenohnědý, příčná zúžení zpravidla ve vzdálenostech 1 mm až 3 mm, jsou asi 0,5 mm až 1 mm široká. Zúžení je patrno přibližně na polovině obvodu, v krajním případě není patrno vůbec.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle šedý až žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: parenchymatické buňky; rafidy šťavelanu vápenatého až 80 μm dlouhé, buď ve svazcích, nebo rozptýlené ve formě písku; úlomky cévic a cév zpravidla 10 μm až 20 μm v průměru, s ohraničenými dvůrky; delší cévy a sklereidy z oddenku.

Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (*V/V*). V parenchymatických buňkách jsou patrna škrobová zrna buď jednotlivá, nebo složená po dvou až osmi, u *C. ipecacuanha* až 15 μm v průměru, u *C. acuminata* až 22 μm v průměru.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,1 g práškované drogy (180) se smíchá ve zkumavce s 0,05 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *etheru R* a směs se důkladně promíchá skleněnou tyčinkou. Po 30 min stání se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 2,5 mg *emetiniumdichloridu CRL* a 30 mg *cefaëliniumdichloridu RCL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *ethylacetatu R* a *toluenu R* (2 + 15 + 18 + 65) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *jodu R* (5 g/l) v *lihu 96% R* a

zahřívá se 10 min při 60 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku je v dolní části žlutá skvrna (emetin) a pod ní světle hnědá (cefaëlin) skvrna. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna odpovídající emetinu fluoreskuje intenzivně žlutě, skvrna odpovídající cefaëlinu světle modrá. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, méně výrazně fluoreskující skvrny.

C. acuminata hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. ipecacuanha liší se od výše uvedeného druhu tím, že skvrna odpovídající cefaëlinu na chromatogramu zkoušeného roztoku je výrazně menší než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (180) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 5,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení obsahu

7,50 g práškované drogy (180) se odváží do suché baňky, přidá se 100 ml *etheru R* a protřepává se 5 min. Pak se přidá 5 ml *amoniaku zředěného RS1* a protřepává se 1 h. Přidá se 5 ml *vody R* a znovu se intenzivně protřepe. Etherová vrstva se po dekantaci zfiltruje chomáčkem vaty. Zbytek v baňce se promyje dvakrát 25 ml *etheru R* a každý etherový podíl se zfiltruje chomáčkem vaty, použitým k první filtraci. Spojené etherové podíly se oddestilují do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *lihu R* 90% (*V/V*), odpaří se do sucha a odparek se suší 5 min při 100 °C. Zbytek po odpaření se zahřátím na vodní lázni rozpustí v 5 ml předem zneutralizovaného *lihu R* 90% (*V/V*). Přidá se 15,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,5 ml *červeně methylové směsného indikátoru R.*

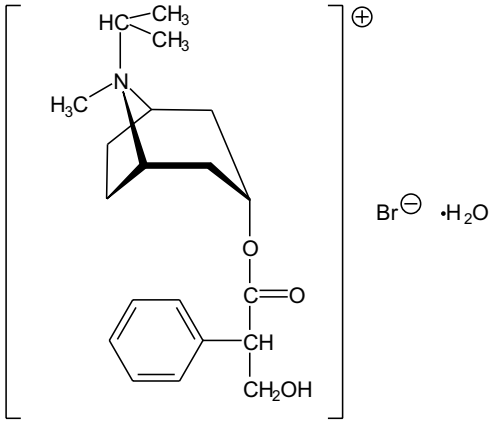
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,03 mg alkaloidů, počítáno jako emetin ($C_{29}H_{40}N_2O_4$).

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.
Separandum.

†† Ipratropii bromidum

Ipratropiumbromid



$C_{20}H_{30}BrNO_3 . H_2O$ M_r 430,38 CAS 66985-17-9

Je to monohydrát 3α-(*RS*)-tropoyloxy-N-isopropyl-1α*H*,5α*H*-tropaniumbromid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{20}H_{30}BrNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu a těžce rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 230 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ipratropiumbromidu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (a). 10 mg *ipratropiumbromidu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (b). 5 mg *methylatropiniumbromidu CRL* se rozpustí v 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R, lihu 96% R* a *dichlormethanu R* (2,5 + 7,5 + 45 + 45) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a potom se postříká *jodobismutitanem draselným RS*. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího rozto-

ku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* nevznikne sraženina.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*, přidá se 0,1 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R;* vzniká fialové zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,5; měří se roztok S.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,10° až +0,10°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *8s-ipratropiumbromidu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 200 ml (roztok A). 1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 objemový díl zkoušeného roztoku se smíchá s dvěma objemovými díly roztoku A.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je roztok obsahující 1,0 g *methansulfonatu sodného R* ve směsi 120 ml *acetonitrilu R* a 1000 ml *kyseliny fosforečné 0,05 mol/l RS*. Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Nastříkne se odděleně 20 µl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku odpovídajícího 8*s*-ipratropiu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího 8*s*-ipratropiu, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píkem ipratropia a píkem 8*s*-ipratropia je nejméně 1,5, jestliže faktor symetrie hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je menší než 2,2 a jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) poměr signálu hlavního píku k šumu je nejméně 5.

Apo-ipratropium. Nejvýše 0,5 %. 0,14 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100 ml. Změří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 246 nm (A_{246}) a 263 nm (A_{263}). Obsah apo-ipratropia v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\left(\frac{A_{246}}{A_{263}} \quad 0{,}863\right) \; . \; 10 \; .$$

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 3,9 % až 4,4 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,24 mg $C_{20}H_{30}BrNO_3$.

Uchovávání

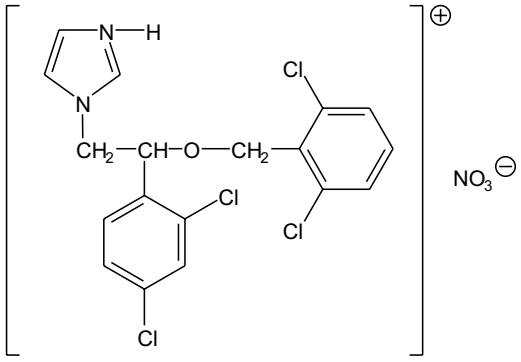
Venenum.

Nečistoty

A. (8*s*)-ipratropium,
B. apo-ipratropium.

† Isoconazoli nitras

Isokonazoliumnitrat



$C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$ M_r 479,15 CAS 24168-96-5

Je to (*RS*)-1-[2-(2,6-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1*H*-imidazoliumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 178 °C až 182 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *isokonazoliumnitratu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *isokonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *isokonazoliumnitratu CRL* a 30 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu a potom se vystaví působení par jodu do vzniku skvrn. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,10° až +0,10°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *isokonazoliumnitratu CRL* a 2,5 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok obsahující 6,0 g *octanu amonného R* ve směsi 300 ml *acetonitrilu R*, 320 ml *methanolu R* a 380 ml *vody R*. Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm.

Kolona sa ustaluje 30 min promýváním mobilní fází při průtokové rychlosti 2 ml/min.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: ekonazolu asi 10 min a isokonazolu asi 14 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem ekonazolu a píkem isokonazolu není menší než 5,0. Je-li třeba, upraví se složení mobilní fáze.

Nastříkne se odděleně 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla, dusičnanového iontu a k píkům s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

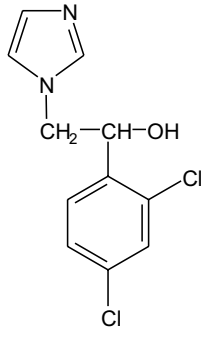
0,350 g se rozpustí v 75 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 47,91 mg $C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$.

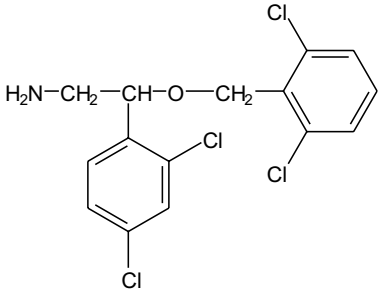
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

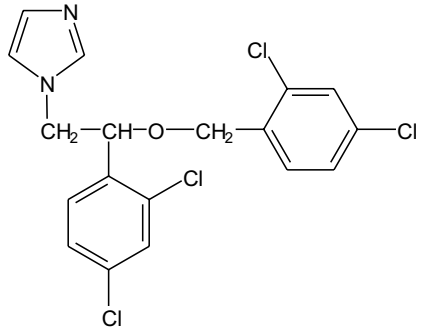
Nečistoty



A. (*RS*)-1-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol,



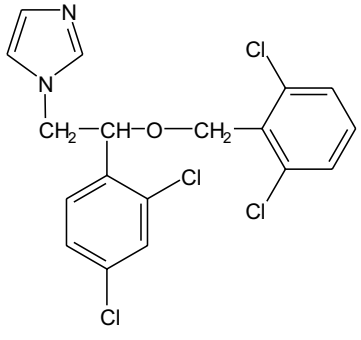
B. (*RS*)-2-(2,6-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethylamin,



C. (*RS*)-1-[2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1*H*-imidazol.

† Isoconazolum

Isokonazol



$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ M_r 416,13 CAS 27523-40-6

Je to (*RS*)-1-[2-(2,6-dichlorobenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1*H*-imidazol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v methanolu, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 111 °C až 115 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *isokonazolu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného oktadecylsilanizovaného silikagelu.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *isokonazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *isokonazolu CRL* a 30 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu a potom se vystaví působení par jodu do vzniku skvrn. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K asi 30 mg se v porcelánovém kelímku přidá 0,3 g *uhličitanu sodného bezvodého R,* zahřívá se 10 min nad plamenem a nechá se vychladnout. Zbytek se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,10° až +0,10°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí ve 3,2 ml *methanolu R*, přidají se 3,0 ml *acetonitrilu R* a zředí se roztokem *octanu amonného R* (6,0 g ve 380 ml *vody R*) na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *isokonazolu CRL* a 2,5 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,1 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok obsahující 6,0 g *octanu amonného R* ve směsi 300 ml *acetonitrilu R*, 320 ml *methanolu R* a 380 ml *vody R*. Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm.

Kolona sa ustaluje 30 min promýváním mobilní fázi při průtokové rychlosti 2 ml/min.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % rozsahu celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: ekonazolu asi 10 min, isokonazolu asi 14 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem ekonazolu a píkem isokonazolu není menší než 5,0. Je-li třeba, upraví se složení mobilní fáze.

Nastříkne se odděleně 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na

chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla, dusičnanového iontu a k píkům s plochou menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny oranžově žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,61 mg $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$.

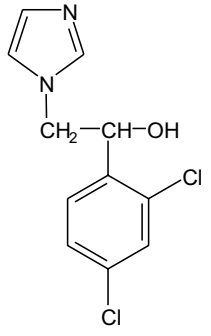
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

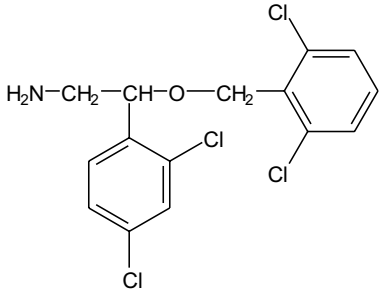
Separandum.

Nečistoty

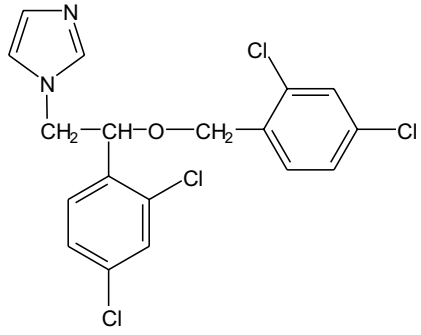
A. (*RS*)-1-[2-(2,6-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1H-imidazoliumnitrat (isokonazoliumnitrat),



B. (*RS*)-1-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol,



C. (*RS*)-2-(2,6-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethylamin,

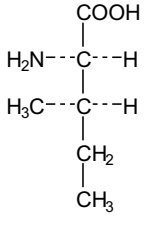


D. (*RS*)-1-[2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1*H*-imidazol.

Isoleucinum

Isoleucin

Synonymum. L-Isoleucinum



$C_6H_{13}NO_2$ M_r 131,17 CAS 73-32-5

Je to kyselina (2*S*,3*S*)-2-amino-3-methylvalerová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{13}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo vločky. Je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml; roztok je pravotočivý.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *isoleucinu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +39,0° až +42,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS1* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *isoleucinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *isoleucinu CRL* a 10 mg *valinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, vysuší se v proudu vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se dvě hodinová sklíčka o průměru 60 mm a umístí se těsně vedle sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarven než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědožlutého zbarvení na zelené.

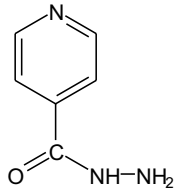
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,12 mg $C_6H_{13}NO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Isoniazidum

Isoniazid



$C_6H_7N_3O$ M_r 137,14 CAS 54-85-3

Je to isonikotinhydrazid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_7N_3O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).4

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 170 °C až 174 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *isoniazidu CRL*.

C. 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 10 ml teplého roztoku *vanilinu R* (10 g/l), nechá se stát a tvorba žluté sraženiny se iniciuje třením skleněné tyčinky o stěnu zkumavky. Sraženina se rekrystalizuje z 5 ml *lihu R 70%* (*V/V*) a vysuší se při 100 °C až 105 °C; taje *(2.2.14)* při 226 °C až 231 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,0; měří se roztok S.

Hydrazin a příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 50,0 mg *hydraziniumsulfatu R* se rozpustí v 50 ml *vody R* a zředí se *acetonem R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml zkoušeného roztoku a zředí se směsí stejných objemových dílů *acetonu R* a *vody R* na 100,0 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R, acetonu R, methanolu R* a *vody R* (50 + 20 + 20 + 10) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %). Vrstva se postříká *dimethylaminobenzaldehydem RS1* a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku se objeví dodatečná skvrna hydrazinu. Žádná odpovídající skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna hydrazinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,05 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 20,0 ml tohoto roztoku se přidá 100 ml *vody R*, 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 0,2 g *bromidu draselného R* a 0,05 ml *červeně methylové RS*. Titruje se po kapkách *bromičnanem draselným 0,0167 mol/l VS* za současného protřepávání do vymizení červeného zbarvení.

1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* odpovídá 3,429 mg $C_6H_7N_3O$.

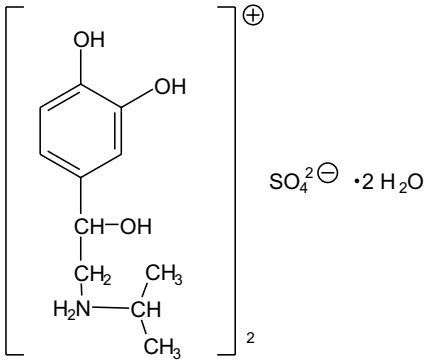
Uchovávání

Separandum.

† Isoprenalini sulfas

Isoprenaliniumsulfat

Synonyma. Isoprenalinium sulfuricum, síran isoprenalinia



$C_{22}H_{36}N_2O_{10}S \cdot 2H_2O$ M_r 556,62 CAS 6700-39-6

Je to dihydrát bis{(*RS*)-[2-hydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-ethyl]isopropylamonium}sulfatu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{22}H_{36}N_2O_{10}S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 128 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,5 g se rozpustí v 1,5 ml *vody R* a přidá se 3,5 ml *2-propanolu R*. K inicializaci krystalizace se stěny zkumavky třou skleněnou tyčinkou. Získané krystaly se suší ve vakuu při 60 °C nad *oxidem fosforečným R*. Stejný postup se provede s *isoprenaliniumsulfatem CRL*. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *isoprenaliniumsulfatu CRL*.

B. K 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,9 ml *vody R* a 0,05 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne zelené zbarvení. Přidá se po kapkách *hydrogenuhličitan sodný RS;* zbarvení roztoku se změní na modré a potom na červené.

C. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml a přidá se 0,25 ml *dusičnanu stříbrného RS1;* během 10 min se začne tvořit lesklá šedá jemná sraženina a roztok zrůžoví.

D. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se *vodou R* na 50 ml. Použije se během 2 h po přípravě.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,3 až 5,5; měří se roztok obsahující 5 ml roztoku S zředěného *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Isoprenalon. 0,20 g se rozpustí v *kyselině sírové 0,005 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 310 nm není větší než 0,20.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 5,0 až 7,5 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *isobutylmethylketonu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 52,06 mg $C_{22}H_{36}N_2O_{10}S$.

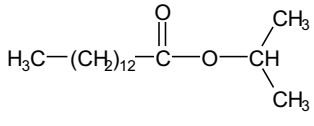
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Isopropylis myristas

Isopropylmyristat

Synonymum. Isopropylum myristicum



$C_{17}H_{34}O_2$ M_r 270,45 CAS 110-27-0

Je to isopropyltetradekanoat. Obsahuje nejméně 90,0 % sloučeniny $C_{17}H_{34}O_2$ a proměnlivá množství isopropylesterů jiných mastných kyselin.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá olejovitá kapalina. Je nemísitelný s vodou, mísitelný s lihem 96%, s etherem, s dichlormethanem, s mastnými oleji a s tekutým parafinem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 2 ml roztoku zkoušené látky (1 g/l) v *lihu 96% R* se převrství čerstvě připraveným roztokem obsahujícím 20 mg *dimethylaminobenzaldehydu R* ve 2 ml *kyseliny sírové R*. Po 2 min na rozhraní obou kapalin vznikne žlutočervené zbarvení, které postupně přechází na červené.

D. Vyhovuje zkoušce na estery *(2.3.1)*. Po zahřátí k varu se ochladí, přidají se 3 ml *lihu 96% R* a okyselí se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.3.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,850 až 0,855.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,434 až 1,437.

Viskozita *(2.2.9)*. 5 mPa.s až 6 mPa.s.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 1,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 202 až 212; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *trikosanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *trikosanu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 250,0 ml.
Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. 20,0 mg *isopropyltetradekanoatu CRL* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 50 m a vnitřního průměru 0,2 mm s vnitřními stěnami pokrytými 0,2 μm vrstvou *polykyanopropylsiloxanu R*,
- *vodíku pro chromatografii R* jako nosného plynu a tlaku 0,15 MPa,
- plamenoionizačního detektoru,
- injektoru s děličem (1/40).

Teplota kolony se zvyšuje ze 125 °C na 185 °C rychlostí 10 °C/min, teplota vstřikovacího prostoru a detektoru se udržují na 250 °C.

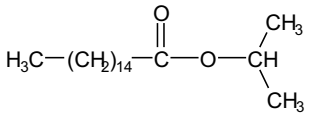
Nastříkne se vhodný objem zkoušeného roztoku (asi 2 μl) a stejný objem porovnávacího roztoku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Isopropylis palmitas

Isopropylpalmitat



$C_{19}H_{38}O_2$ M_r 298,51 CAS 142-91-6

Je to isopropylhexadekanoat. Obsahuje nejméně 90,0 % sloučeniny $C_{19}H_{38}O_2$ a proměnlivá množství isopropylesterů jiných mastných kyselin.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá olejovitá kapalina. Je nemísitelný s vodou, mísitelný s lihem 96%, s etherem, s dichlormethanem, s mastnými oleji a s tekutým parafinem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 2 ml roztoku zkoušené látky (1 g/l) v *lihu 96% R* se převrství čerstvě připraveným roztokem obsahujícím 20 mg *dimethylaminobenzaldehydu R* ve 2 ml *kyseliny sírové R*. Po 2 min na rozhraní obou kapalin vznikne žlutočervené zbarvení, které postupně přechází na červené.

D. Vyhovuje zkoušce na estery *(2.3.1)*. Po zahřátí k varu se ochladí, přidají se 3 ml *lihu 96% R* a okyselí se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.3.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,436 až 1,440.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,850 až 0,855.

Viskozita *(2.2.9)*. 5 mPa.s až 10 mPa.s.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 1,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 183 až 193; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *trikosanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *trikosanu R* se rozpustí v *heptanu R* a zředí se jím na 250,0 ml.
Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. 20,0 mg *isopropylhexadekanoatu CRL* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 50 m a vnitřního průměru 0,2 mm s vnitřními stěnami pokrytými 0,2 μm vrstvou *polykyanopropylsiloxanu R*,
- *vodíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při tlaku 0,15 MPa,
- plamenoionizačního detektoru,
- injektoru s děličem (1/40).

Teplota kolony se zvyšuje ze 125 °C na 185 °C rychlostí 10 °C/min, teplota vstřikovacího prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C.

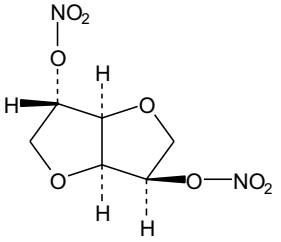
Nastříkne se vhodný objem zkoušeného roztoku (asi 2 μl) a stejný objem porovnávacího roztoku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Isosorbidi dinitras dilutus

Triturace isosorbiddinitratu



$C_6H_8N_2O_8$ M_r 236,14 CAS 87-33-2

Je to triturace isosorbiddinitratu a monohydrátu laktosy nebo mannitolu. Obsahuje nejméně 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol-2,5-dinitratu.

Upozornění: neředěný isosorbiddinitrat může při otřesu nebo zahřátí explodovat. Proto je třeba zacházet s ním opatrně a pracovat jen s velmi malým množstvím.

Vlastnosti

Neředěný isosorbiddinitrat je jemný bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v acetonu a mírně rozpustný v lihu 96%.

Rozpustnost triturace isosorbiddinitratu závisí na pomocné látce a její koncentraci.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety připravené ze zbytku zkoušené látky ze Zkoušky totožnosti D se shoduje se spektrem tablety *isosorbiddinitratu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 10 mg isosorbiddinitratu se protřepává 5 min 10 ml *lihu 96% R* a pak se zfiltruje.
Porovnávací roztok. Množství *isosorbiddinitratu CRL* odpovídající 10 mg isosorbiddinitratu se protřepává 5 min 10 ml *lihu 96% R* a pak se zfiltruje.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pak se postříká čerstvě připraveným *škrobem s jodidem draselným RS* a vrstva se vystaví na 15 min působení ultrafialového světla při 254 nm. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 0,10 g laktosy nebo mannitolu se protřepává 10 ml *vody R*, v případě potřeby se zfiltruje.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *laktosy R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,10 g *mannitolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). Smíchají se stejná objemová množství porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a startovní body se dobře usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm.

Poměry jednotlivých složek mobilní fáze je třeba dodržet, i malý nadbytek vody způsobí zákal.

Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a vyvíjení se ihned opakuje za použití nově připravené směsi, pak se vrstva usuší v proudu horkého vzduchu a postříká se *kyselinou 4-aminobenzoovou RS*. Vrstva se suší v proudu studeného vzduchu do odstranění pachu acetonu a pak se zahřívá 15 min při 100 °C. Po ochlazení se postříká roztokem *jodistanu sodného R* (2 g/l), usuší se v proudu studeného vzduchu a zahřívá se 15 min při 100 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) odpovídající laktose nebo hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) odpovídající mannitolu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

D. Množství zkoušené látky odpovídající 25 mg isosorbiddinitratu se protřepává 5 min 10 ml *acetonu R*, pak se zfiltruje a odpaří do sucha při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek se suší 16 h nad *oxidem fosforečným R* při tlaku 0,7 kPa. Teplota tání *(2.2.14)* zbytku je 69 °C až 72 °C.

Zkoušky na čistotu

Anorganické nitraty. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 0,10 g isosorbiddinitratu se protřepává s 5 ml *lihu 96% R* a pak se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 10 mg *dusičnanu draselného R* se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R* a *toluenu R* (15 + 30 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší v proudu vzduchu do odstranění pachu kyseliny octové. Pak se důkladně postříká čerstvě připraveným *škrobem s jodidem draselným RS* a vystaví se na 15 min působení ultrafialového světla při 254 nm. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající nitratovému iontu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %, počítáno jako dusičnan draselný).

Isosorbid-5-nitrat, isosorbid-2-nitrat. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*, viz Stanovení obsahu, při vlnové délce 210 nm až 215 nm.

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: isosorbiddinitratu asi 5 min; isosorbid-2-nitratu asi 8 min; isosorbid-5-nitratu asi 11 min.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (c). Při použití zapisovače se nastaví citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) byla nejméně 20 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (e). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) rozlišení mezi píky isosorbiddinitratu a isosorbid-2-nitratu je nejméně 6,0.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku (a), 10 μl porovnávacího roztoku (c) a 10 μl porovnávacího roztoku (d). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není plocha píku odpovídajícího isosorbid-2-nitratu větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %) a plocha píku isosorbid-5-nitratu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %).

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). Množství zkoušené látky odpovídající 25,0 mg *isosorbiddinitratu CRL* se smíchá s 20 ml mobilní fáze a míchá se 15 min pomocí ultrazvuku, pak se zředí mobilní fází na 25,0 ml a zfiltruje se vhodným membránovým filtrem.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). Množství *isosorbiddinitratu CRL* odpovídající 25,0 mg isosorbiddinitratu se smíchá s 20 ml mobilní fáze a míchá se 15 min pomocí ultrazvuku, pak se zředí mobilní fází na 25,0 ml a zfiltruje se vhodným membránovým filtrem.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *isosorbid-2-nitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 10,0 mg *isosorbidmononitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 5 mg *isosorbid-2-nitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 0,5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem aminopropylmethylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *ethanolu R* a *trimethylpentanu R* (15 + 85), při průtokové rychlosti 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Při použití zapisovače se nastaví citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Pokud se plochy píků dvou po sobě následujících nástřiků liší o více než 1,0 %, nastříkne se roztok ještě čtyřikrát a spočítá se relativní směrodatná odchylka ze všech šesti nástřiků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka šesti nástřiků není větší než 2,0 %.

Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (b).

Vypočítá se obsah isosorbiddinitratu v procentech deklarovaného obsahu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

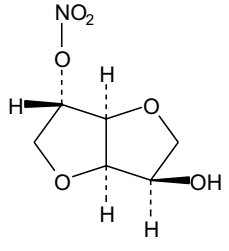
Separandum.

Označování

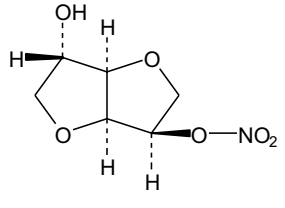
V označení na obalu se uvede obsah isosorbiddinitratu v procentech.

Nečistoty

A. anorganické dusičnany,



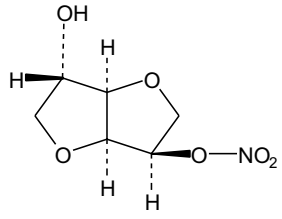
B. isosorbid-2-nitrat,



C. isosorbid-mononitrat (isosorbid-5-nitrat).

† Isosorbidi mononitras dilutus

Triturace isosorbidmononitratu



$C_6H_9NO_6$ M_r 191,14 CAS 16051-77-7

Je to triturace isosorbidmononitratu a monohydrátu laktosy nebo mannitolu. Obsahuje 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol-5-nitratu.

Vlastnosti

Neředěný isosorbidmononitrat je bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Rozpustnost triturace isosorbidmononitratu závisí na pomocné látce a její koncentraci.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zbytku zkoušené látky ze Zkoušky totožnosti D se shoduje se spektrem tablety *isosorbidmononitratu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 10 mg isosorbidmononitratu se protřepává 5 min s 10 ml *lihu 96% R* a pak se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 10 mg *isosorbidmononitratu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pak se postříká čerstvě připraveným *škrobem s jodidem draselným RS* a vrstva se vystaví na 15 min působení ultrafialového světla při 254 nm. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 0,10 g laktosy nebo mannitolu se protřepává s 10 ml *vody R*, v případě potřeby se zfiltruje.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *laktosy R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,10 g *mannitolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). Smíchají se stejné objemové díly porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a nanesené body se dobře usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm.

Poměry jednotlivých složek mobilní fáze je třeba přesně dodržet, i malý nadbytek vody způsobí zákal.

Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a vyvíjení se ihned opakuje za použití nově připravené mobilní fáze. Usuší se v proudu teplého vzduchu a postříká se *kyselinou 4-aminobenzoovou RS*. Vrstva se suší v proudu studeného vzduchu do odstranění pachu acetonu a pak se suší 15 min při 100 °C. Po ochlazení se postříká roztokem *jodistanu sodného R* (2 g/l), usuší se v proudu studeného vzduchu a zahřívá se 15 min při 100 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) odpovídající laktose nebo hlavní skvrně na chromatogramu (b) odpovídající mannitolu.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

D. Množství zkoušené látky odpovídající 25 mg isosorbidmononitratu se protřepává 5 min s 10 ml *acetonu R*, pak se zfiltruje a odpaří do sucha při teplotě nepřesahující 40 °C. Zbytek se suší 16 h nad *oxidem fosforečným R* při tlaku 0,7 kPa. Teplota tání *(2.2.14)* zbytku je 89 °C až 91 °C.

Zkoušky na čistotu

Anorganické dusičnany. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 0,10 g isosorbidmononitratu se protřepává s 5 ml *lihu 96% R* a pak se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 10 mg *dusičnanu draselného R* se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R* a *toluenu R* (15 + 30 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší v proudu vzduchu do odstranění pachu kyseliny octové. Pak se důkladně postříká čerstvě připraveným *škrobem s jodidem draselným RS* a vystaví se na 15 min působení ultrafialového světla při 254 nm. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající dusičnanovému iontu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %, počítáno jako dusičnan draselný).

Isosorbiddinitrat, isosorbid-2-nitrat. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*, viz Stanovení obsahu, při vlnové délce 210 nm až 215 nm.

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: isosorbiddinitratu asi 5 min; isosorbid-2-nitratu asi 8 min; isosorbid-5-nitratu asi 11 min.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b). Při použití zapisovače se nastaví citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 20 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (d). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je rozlišení mezi píky isosorbid-2-nitratu a isosorbid-5-nitratu nejméně 4,0.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku (a), 10 μl porovnávacího roztoku (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (c). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není plocha píku odpovídajícího isosorbid-2-nitratu větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a plocha píku isosorbiddinitratu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). Množství zkoušené látky odpovídající 25,0 mg isosorbidmononitratu se smíchá s 20 ml mobilní fáze a míchá se 15 min pomocí ultrazvuku, pak se zředí mobilní fází na 25,0 ml a zfiltruje se vhodným membránovým filtrem.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *isosorbidmononitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *isosorbid-2-nitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (c). Množství *isosorbiddinitratu CRL* odpovídající 10,0 mg isosorbiddinitratu se smíchá s 15 ml mobilní fáze a míchá se 15 min pomocí ultrazvuku, pak se zředí mobilní fází na 20,0 ml a zfiltruje se vhodným membránovým filtrem. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 5 mg *isosorbidmononitratu CRL* a 5 mg *isosorbid-2-nitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem aminopropylmethylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *ethanolu R* a *trimethylpentanu R* (15 + 85), při průtokové rychlosti 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při použití zapisovače se nastaví citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Pokud se plochy píků dvou po sobě následujících nástřiků liší o více než 1,0 %, nastříkne se roztok ještě čtyřikrát a spočítá se relativní směrodatná odchylka ze všech šesti nástřiků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka šesti nástřiků není větší než 2,0 %. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

Vypočítá se obsah isosorbidmononitratu v procentech deklarovaného obsahu.

Uchovávání

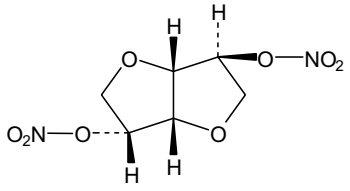
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Označování

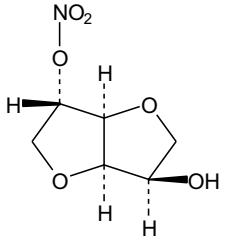
V označení na obalu se uvede obsah isosorbidmononitratu v procentech.

Nečistoty

A. anorganické dusičnany,



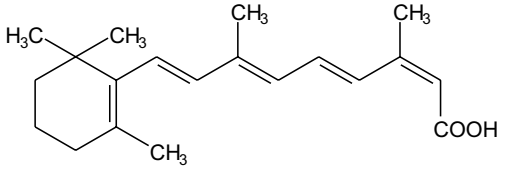
B. isosorbid-dinitrat,



C. isosorbid-2-nitrat.

† Isotretinoinum

Isotretinoin



$C_{20}H_{28}O_2$ M_r 300,44 CAS 4759-48-2

Je to kyselina (2*Z*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{28}O_2$.

Vlastnosti

Žlutý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v etheru, těžce rozpustný v lihu 96 %. Vlivem tepla, světla a vzduchu se rozkládá, zejména v roztoku.

Všechny postupy se provádějí co nejrychleji a za ochrany před světlem; použijí se čerstvě připravené roztoky.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 75,0 mg se rozpustí v 5 ml *dichlormethanu R* a ihned se zředí okyseleným *2-propanolem R* (připraví se zředěním 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS 2-propanolem R* na 1000 ml) na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí okyseleným *2-propanolem R* na 100,0 ml a 5,0 ml takto zředěného roztoku se dále zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 300 nm až 400 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 354 nm. Specifická absorbance v maximu je 1290 až 1420.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *isotretinoinu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *isotretinoinu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *isotretinoinu CRL* a 10 mg *tretinoinu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R*, *etheru prostého peroxidických látek R* a *cyklohexanu R* (2 + 4 + 40 + 54) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 2 ml *chloridu antimonitého RS;* vzniká intenzivní červené zbarvení, které se později změní na fialové.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *tretinoinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) a 0,5 ml zkoušeného roztoku se promíchá a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok *kyseliny octové ledové R* 0,5% *(V/V)* ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *vody R* v takovém poměru, aby retenční čas tretinoinu byl asi 15 min (obvykle 77 + 23). Průtoková rychlost je 1,4 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 353 nm.

Odděleně se nastříkne po 10 μl každého z porovnávacích roztoků (b), (c) a (d) a zkoušeného roztoku. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnáva

cího roztoku (b) nebyla menší než 70 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky isotretinoinu a tretinoinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je nejméně 2,0. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího tretinoinu není větší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku rozpouštědla a píku tretinoinu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce (d) na těžké kovy. K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 16 h ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 70 ml *acetonu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,04 mg $C_{20}H_{28}O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Doporučuje se chránit zbylý obsah otevřeného použitého obalu v atmosféře inertního plynu.

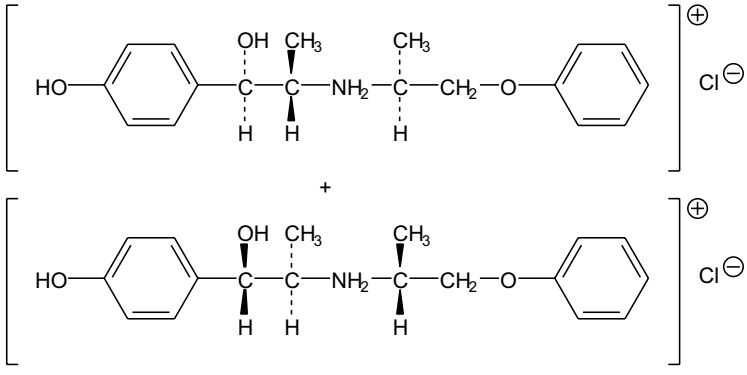
Separandum.

Nečistoty

A. tretinoin,
B. kyselina (2*Z*,4*E*,6*Z*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová (kyselina 9,13-di-*cis*-retinoová),
C. kyselina (2*Z*,4*Z*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová (kyselina 11,13-di-*cis*-retinoová),
D. kyselina (2*E*,4*E*,6*Z*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová (kyselina 9-*cis*-retinoová),
E. oxidační produkty isotretinoinu.

† Isoxsuprini hydrochloridum

Isoxsupriniumchlorid



$C_{18}H_{24}ClNO_3$ $_r$337,85 CAS 579-56-6

Je to (1*RS*,2*SR*)[1-hydroxy-1-(4-hydroxyfenyl)]isopropyl-(1*SR*)-1-fenoxyisopropylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{24}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a dichlormethanu.

Taje asi při 205 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.

Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě maxima, při 269 nm a 275 nm. Specifické absorbance v maximu při 269 nm je 71 až 74 a v maximu při 275 je 70 až 73. Zkoušku lze hodnotit, jestliže při zkoušce rozlišení (*2.2.25*) poměr absorbancí je nejméně 1,7.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety připravené z *bromidu draselného R* a zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *isoxsupriniumchloridu CRL* připravené stejným způsobem. Pokud spektra vykazují rozdíly, rozpustí se 50 mg zkoušené látky a porovnávací látky odděleně ve 2 ml *methanolu R*, přidá se 15 ml *dichlormethanu R,* odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GR.*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok. 20 mg *isoxsupriniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (0,25 + 15 + 85) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (10 g/l). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K 1 ml roztoku S (viz Zkoušky na čistotu) se přidá 0,05 ml *síranu měďnatého RS* a 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* roztok zmodrá. Přidá se 1 ml *etheru R*, protřepe se a vrstvy se nechají oddělit; horní vrstva zůstává bezbarvá.

E. 2 ml roztoku S vyhovují zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, ochladí se a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,0; měří se roztok S.

Optická otáčivost (*2.2.7*). Úhel optické otáčivosti roztoku S je -0,05° až +0,05°.

Fenony. 10,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) měřená v maximu při 310 nm je nejvýše 0,10 (1,0 %, počítáno jako nečistota B).

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *hexakosanu R* jako vnitřního standardu. *Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Roztok vnitřního standardu (a). 0,1 g *hexakosanu R* se rozpustí v *trimethylpentanu R* a zředí se jím na 20 ml.
Roztok vnitřního standardu (b). 1 ml vnitřního standardu (a) se zředí *trimethylpentanem R* na 50 ml.
Zkoušený roztok. K 10,0 mg se přidá 0,5 ml *N-trimethylsilylimidazolu R*. Zahřívá se 10 min při 65 °C. Nechá se vychladnout, potom se přidají 2,0 ml roztoku vnitřního standardu (b) a 2,0 ml *vody R* a protřepe se. Použije se horní vrstva.
Porovnávací roztok (a). K 10,0 mg se přidá 0,5 ml *N-trimethylsilylimidazolu R*. Zahřívá se 10 min při 65 °C, nechá se vychladnout, potom se přidají 2,0 ml roztoku vnitřního standardu (a) a 2,0 ml *vody R*. Protřepe se a 1,0 ml horní vrstvy se zředí *trimethylpentanem R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). K 10,0 mg zkoušené látky se přidá 0,5 ml *N-trimethylsilylimidazolu R* a zahřívá se 10 min při 65 °C. Nechá se vychladnout, potom se přidají 2,0 ml *trimethylpentanu R* a 2,0 ml *vody R* a protřepe se. Použije se horní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (125 µm až 135 µm), impregnovanou 3 % *polydimethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 25 min na 195 °C, potom se zvyšuje rychlostí 5 °C/min na 215 °C, při níž se udržuje 10 min; teplota nástřikového prostoru a detektoru je 225 °C.

Nastříkne se 1 µl porovnávacího roztoku (a). Látky se eluují v následujícím pořadí: isoxsuprin a hexakosan. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výšky dvou hlavních píků nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaném chromatogramu je rozlišení mezi píkem odpovídajícím isoxsuprinu a píkem odpovídajícím hexakosanu nejméně 5,0.

Nastříkne se 1 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu se ověří, že neobsahuje žádný pík se stejným retenčním časem jako vnitřní standard.

Nastříkne se 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) se vypočte poměr (*R*) plochy píku trimethylsilylderivátu isoxsuprinu k ploše píku vnitřního standardu. Z chromatogramu zkoušeného roztoku se vypočte poměr součtu ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku vnitřního standardu a píku rozpouštědla, k ploše píku vnitřního standardu: tento poměr není větší než *R* (2,0 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 80 ml *lihu 96% R,* přidá se 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

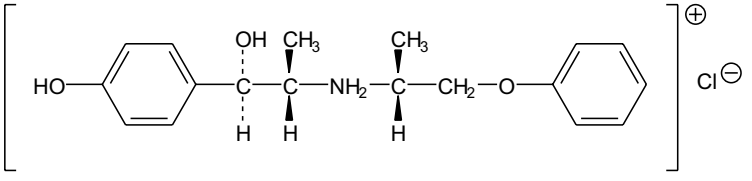
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,78 mg $C_{18}H_{24}ClNO_3$.

Uchovávání

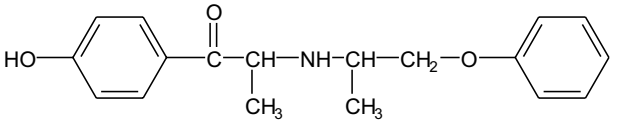
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



A. (1*RS*,2*SR*)-[1-hydroxy-1-(4-hydroxyfenyl)]isopropyl-(1*RS*)-1-fenoxyisopropylamoniumchlorid.



B. 1-(4-hydroxyfenyl)-2-(2-fenoxyethylamino-1-methyl)propan-1-on.

Juniperi fructus

N

Jalovcový plod

Synonymum. Fructus juniperi

Je to usušený zralý plod druhu *Juniperus communis* L. Obsahuje nejméně 10 ml silice v 1 kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga aromatického pachu a chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kulovitý plod o průměru až 10 mm, fialově hnědý až černohnědý, lysý, často modře ojíněný. Je tvořen třemi masitými plodními šupinami. Na temeni plodu třípaprsčitý šev s nezřetelnými hrboly mezi jednotlivými paprsky, na bázi plodu často zbytek stopky. V nahnědlém drolivém parenchymu jsou uložena tři, řidčeji dvě malá, podlouhlá, ostře trojhranná, na hřbetní straně mírně zaoblená, velmi tvrdá semena. Na zevní straně jsou obklopena velkými siličnými nádržkami s pryskyřičnatým, lepivým obsahem.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky oplodí z buněk se stěnami ztlustlými, tečkovanými, vyplněné hnědou hmotou; anomocytické průduchy (*2.8.3*) jen zřídka; úlomky pokožky z temene plodu se zubovitými buňkami; úlomky hypodermis s buňkami ztlustlými, kolenchymatickými; velké, okrouhlé, tenkostěnné buňky mezokarpu se světlým až nahnědlým zrnitým obsahem; nepravidelné, velké nažloutlé idioblasty se stěnami mírně ztlustlými až mírně zdřevnatělými a s několika štěrbinovitými dvůrky (soudečkové buňky); úlomky osemení s buňkami ztlustlými, sklerenchymatickými, z nichž každá obsahuje krystal šťavelanu vápenatého; úlomky endospermu s buňkami tenkostěnnými, obsahujícími olej a aleuronová zrna.

C. 0,5 g práškované drogy (710) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se zfiltruje. 1 ml filtrátu se opatrně smíchá s 1 ml *kyseliny sírové R*; vznikne červenofialové zbarvení.

D. Zbytek filtrátu ze Zkoušky totožnosti C se odpaří na vodní lázni do sucha. Odparek se smíchá s 5 ml *vody R* a zahřívá se 2 min na vodní lázni. Po ochlazení se zfiltruje. 2 ml filtrátu se smíchá s 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*; vznikne žlutooranžové zbarvení.

E. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 5 ml *dichlormethanu R* a protřepává se 2 min až 3 min, pak se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 10 μl *cineolu R* a 4,0 mg *guajazulenu R* se rozpustí v 10 ml *dichlormethanu R.* Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se *dichlormethanem R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině hnědá

až šedofialová skvrna (cineol) a v blízkosti čela chromatogramu oranžově hnědá skvrna (guajazulen). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je široká nepravidelná červenofialová skvrna (diterpenové kyseliny) s hodnotou R_F nižší než hodnota R_F cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Další intenzivní červenofialová skvrna (monoterpeny, seskviterpeny) je v poloze odpovídající přibližně skvrně guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku. V poloze vymezené skvrnami cineolu a guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku, jsou většinou čtyři načervenalé nebo modrofialové skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 15 % hnědých a nezralých plodů.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 20,0 %; 2,000 g drogy se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 4,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 20,0 g lehce rozmačkané drogy se destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce se 200 ml *vody R*; do dělené trubice se přidá 0,5 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Kalii acetas

Octan draselný

$C_2H_3KO_2$ M_r 98,14 CAS 127-08-2

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_2H_3KO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce (a) na octany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Redukující látky. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 100 ml, přidá se 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (0,32 g/l), promíchá se a opatrně se 5 min vaří; roztok zůstane růžový.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Jestliže je látka určena pro výrobu roztoků pro peritoneální dialýzu, hemofiltračních roztoků nebo hemodialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník.

2,0 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a přidá se 5 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (1 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije směs 1 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 5 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 49 ml *vody R*. Připraví se kontrolní roztok za použití směsi 5 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 50 ml *vody R*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (4 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Sodík. Nejvýše 0,5 %; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)* a zředěním dle potřeby *vodou R*.

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,81 mg $C_2H_3KO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před vlhkostí.

Kalii aluminii sulfas

Síran draselno-hlinitý

Synonyma. Aluminium kalium sulfuricum, Alumen, síran hlinito-draselný

$KAl(SO_4)_2 . 12H_2O$ M_r 474,38 CAS 7784-24-9

Je to dodekahydrát síranu draselno-hlinitého. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $KAl(SO_4)_2 . . 12H_2O$.

Vlastnosti

Granulovaný prášek nebo bezbarvá průhledná krystalická hmota. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný ve vroucí vodě, dobře rozpustný v glycerolu, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na sírany *(2.3.1)*.

B. Roztok S vyhovuje zkoušce na hliník *(2.3.1)*.

C. 10 ml roztoku S se protřepe s 0,5 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 3,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Amonium *(2.4.1)*. K 1 ml roztoku S se přidají 4 ml *vody R*. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 14 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na amonium (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 2 ml roztoku S zředěné *vodou R* na 10 ml vyhovují limitní zkoušce na železo (100 μg/g). Při zkoušce se použije 0,3 ml *kyseliny thioglykolové R*.

Stanovení obsahu

0,900 g se rozpustí ve 20 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace hliníku *(2.5.11)*.
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 47,44 mg $KAl(SO_4)_2 . 12H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Kalii bromidum

Bromid draselný

Synonymum. Kalium bromatum

KBr M_r 119,00 CAS 7758-02-3

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny KBr.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě a v glycerolu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na bromidy *(2.3.1)*.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Bromičnany. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *škrobu RS*, 0,1 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a 0,25 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS* a nechá se stát 5 min chráněn před světlem; nevzniká žádné modré nebo fialové zbarvení.

Chloridy. 1,000 g se rozpustí v kuželové baňce ve 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, přidá se 5 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a zahřívá se na vodní lázni až do úplného odbarvení. Stěny baňky se omyjí malým množstvím *vody R*, 15 min se zahřívá na vodní lázni, ochladí se, zředí *vodou R* na 50 ml a přidá se 5,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 1 ml *dibutylftalatu R*. Protřepe se a titruje *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 5 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru. Spotřeba *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* je nejvýše 1,7 ml (0,6 %). Zjištěná spotřeba *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* se použije ve zkoušce Stanovení obsahu.

Jodidy. K 5 ml roztoku S se přidá 0,15 ml *chloridu železitého RS1* a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se. Po oddělení je chloroformová vrstva bezbarvá *(2.2.2, Metoda I)*.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Baryum. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody destilované R* a 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Roztok po 15 min neopalizuje intenzivněji než směs 5 ml roztoku S a 6 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S zředěného na 10 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Hořčík a kovy alkalických zemin *(2.4.7)*. 10,0 g vyhovuje limitní zkoušce na hořčík a kovy alkalických zemin. Spotřeba *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* je nejvýše 5,0 ml (200 μg/ml, počítáno jako Ca).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,00 g se 3 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 50 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R* a promíchá se. Titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru a za intenzivního míchání před koncem titrace. Od nalezené spotřeby *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* se odečte spotřeba *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* zjištěná při limitní zkoušce na chloridy.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,90 mg KBr.

Kalii carbonas

N

Uhličitan draselný

K_2CO_3 M_r 138,21 CAS 584-08-7

Vysušen předepsaným způsobem, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny K_2CO_3.

Vlastnosti

Bílý zrnitý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Na vzduchu přijímá oxid uhličitý a přechází pomalu na hydrogenuhličitan draselný, který lze krátkým vyžíháním látky převést zpět na uhličitan draselný.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R;* roztok je silně zásaditý (*2.2.4*).

B. 2 ml roztoku získaného ve zkoušce A vyhovují zkoušce na uhličitany a hydrogenuhličitany *(2.3.1)*.

C. 1 ml roztoku získaného ve zkoušce A vyhovuje zkoušce na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 4,0 g se rozpustí po částech ve směsi 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 50 ml *vody destilované R*. Zahřeje se k varu, ochladí se, zneutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* na *papír lakmusový červený R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 100 ml.

Vzhled roztoku. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Alkalické hydroxidy a hydrogenuhličitany. 0,4 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 20 ml *chloridu barnatého RS1* a zfiltruje se. K 10 ml čirého filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok se nezbarví červeně. Zbytek filtrátu se 2 min vaří; roztok zůstane čirý (*2.2.1*).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,4 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny dusičné R* a 5 ml *vody R* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (125 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (250 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na amonium (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 4 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)* a 11 ml *vody R*.

Arsen (*2.4.2*). 12,5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na vápník (100 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 6 ml základního *roztoku vápníku (10 μg Ca/ml)* a 9 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 0,300 g se suší 5 h v sušárně při 120 °C.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,1 ml *oranže methylové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na žlutavě růžové. Roztok se opatrně zahřeje a vaří nejméně 2 min; zbarvení roztoku se změní na žluté. Po ochlazení se znovu titruje do vzniku žlutavě růžového zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 69,1 mg K_2CO_3.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Kalii chloridum

Chlorid draselný

Synonymum. Kalium chloratum

KCl M_r 74,55 CAS 7447-40-7

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny KCl.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na chloridy *(2.3.1)*.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Bromidy. 1,0 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 50 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml *červeně fenolové RS2*, 1,0 ml *chloraminu T RS1* a okamžitě se zamíchá. Ihned po 2 min se přidá 0,15 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS*, zamíchá se a zředí *vodou R* na 10,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 590 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným postupem za použití 5 ml roztoku *bromidu draselného R* (3,0 mg/l) (0,1 %).

Jodidy. 5 g se po kapkách navlhčí čerstvě připravenou směsí 0,15 ml *dusitanu sodného RS*, 2 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS,* 25 ml *škrobu prostého jodidů RS* a 25 ml *vody R*. Po 5 min nevykazuje navlhčená substance v denním světle žádné modré zbarvení.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Baryum. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody destilované R* a 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Roztok po 15 min neopalizuje intenzivněji než směs 5 ml roztoku S a 6 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Hořčík a kovy alkalických zemin *(2.4.7)*. 10,0 g vyhovuje limitní zkoušce na hořčík a kovy alkalických zemin. Spotřeba *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* je nejvýše 5,0 ml (200 μg/g, počítáno jako Ca).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Sodík. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků nebo hemodialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na sodík.

Nejvýše 0,1 % Na; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. 0,5084 g *chloridu sodného R* předem sušeného 3 h při 100 °C až 105 °C se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml (200 μg Na/ml). Naředí se na požadovanou koncentraci.

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena k výrobě hemodialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník.

4 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (1 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Jako kontrolní roztok se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Stanovení obsahu

1,300 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 50 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 2 ml *dibutylftalatu R* a promíchá se. Titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru a za intenzivního míchání před koncem titrace. 1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 7,46 mg KCl.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků,
- zda je látka vhodná pro výrobu hemodialyzačních roztoků.

Kalii citras

Citronan draselný

$C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$ M_r 324,41 CAS 6100-05-6
M_r bezvodého 306,40

Je to monohydrát draselné soli kyseliny 2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_5K_3O_7$.

Vlastnosti

Bílý granulovaný prášek nebo průsvitné krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 4 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce na citronany *(2.3.1)*.

B. 0,5 ml roztoku S vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Snadno zuhelnitelné látky. K 0,20 g rozetřené zkoušené látky se přidá 10 ml *kyseliny sírové R*, zahřívá se 60 min ve vodní lázni při (90 ± 1) °C a pak se rychle ochladí. Roztok se nezbarví intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_2$ nebo $ZŽ_2$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Šťavelany. 0,50 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 g *zinku R* granulovaného a zahřívá se 1 min na vodní lázni. Nechá se 2 min stát, tekutina se dekantuje do zkumavky s 0,25 ml roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l) a zahřeje se k varu. Směs se rychle ochladí a v odměrném válci se smíchá se stejným množstvím *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,25 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*, protřepe se a nechá 30 min stát. Roztok se nezbarví intenzivněji růžově než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 4 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (0,05 g/l) (300 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Sodík. Nejvýše 0,3 %; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 100 ml.
Porovnávací roztoky. Porovnávací roztok *chloridu sodného R* obsahující 1 mg Na/ml se zředí podle potřeby *vodou destilovanou R*.

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,0 % až 7,0 %; stanoví se s 0,500 g. Před titrací se směs míchá 15 min po přidání zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí zahřátím na asi 50 °C ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Ochladí se a titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,25 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do vzniku zeleného zbarvení.

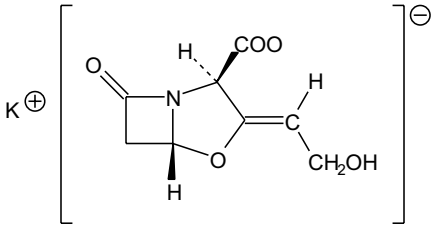
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,21 mg $C_6H_5K_3O_7$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Kalii clavulanas

Draselná sůl kyseliny klavulanové



$C_8H_8KNO_5$ M_r 237,25 CAS 61177-45-5

Je to draselná sůl kyseliny *(Z)*-(2*R*,5*R*)-3-(2-hydroxyethyliden)-7-oxo-4-oxy-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-2-karboxylové produkované určitými kmeny *Streptomyces clavuligerus* nebo získaná jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_8H_8KNO_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, velmi těžce rozpustná v acetonu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. draselné soli kyseliny klavulanové.*

B. Vyhovuje zkoušce (b) na draslík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,400 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5; měří se 5 ml roztoku S zředěného *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +53° až +63°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Absorbance (*2.2.25*). 50,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,0 (0,1 mol/l)* a zředí se jím na 50,0 ml. Absorbance roztoku měřená ihned po jeho přípravě při 278 nm je nejvýše 0,40.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Roztoky se připravují těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,250 g se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *lithné soli kyseliny klavulanové CRL* a 10 mg *amoxicillinu trihydrátu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (7,8 g/l) upraveného *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu pH 4,0 (mobilní fáze A) a *methanolu R1* (mobilní fáze B), při průtokové rychlosti 2 ml/min a s následujícím gradientovým programem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0 - 4	100	0
4 - 15	100 → 50	0 → 50
15 - 18	50	50

- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška prvního píku (klavulan) na chromatogramu byla nejméně 70 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (klavulan) a druhým píkem (amoxicillin) je nejméně 10.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 10násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,02násobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Terc.butylamin (1,1-dimethylethylamin). Nejvýše 0,2 %, stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve 3,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l) a protřepe se s 5,0 ml *dichlormethanu R.* Použije se spodní vrstva.
Porovnávací roztok. 5,0 ml roztoku *terc.butylaminu R* (80 mg/l) v *dichlormethanu R* se protřepe se 3,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l). Použije se spodní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 4 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* (135 µm až 175 µm) impregnovanou 8 % *makrogolu 20 000 R* a 2 % *hydroxidu draselného R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C, teplota nástřikového prostoru na 150 °C, teplota detektoru na 180 °C.

Draselná sůl kyseliny klavam-2-karboxylové. Nejvýše 0,01 %, stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok obsahující asi 1,9 µg/ml *draselné soli kyseliny klavam-2-karboxylové CRL.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,3 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 µm),
- mobilní fáze, kterou je roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l) upravený *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotou pH 4,0, s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku. Citlivost systému se nastaví tak, aby pík s retenčním časem přibližně 11 min byl měřitelný. Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku.

Obsah draselné soli kyseliny klavam-2-karboxylové se vypočítá z ploch hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku a odpovídajícího píku na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,5 %, stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,03 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *octanu sodného R* (4,1 g/l) předem upraveným *kyselinou octovou ledovou R* na hodnotu pH 6,0 a zředí se stejným roztokem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *lithné soli kyseliny klavulanové CRL* se rozpustí v roztoku *octanu sodného R* (4,1 g/l) předem upraveného *kyselinou octovou ledovou R* na hodnotu pH 6,0 a zředí se stejným roztokem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 50,0 mg *lithné soli kyseliny klavulanové CRL* a 50,0 mg *amoxicillinu trihydrátu CRL* se rozpustí v roztoku *octanu sodného R* (4,1 g/l) předem upraveného *kyselinou octovou ledovou R* na hodnotu pH 6,0 a zředí se stejným roztokem na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,3 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí 5 objemových dílů *methanolu R1* a 95 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15 g/l) předem upraveného *kyselinou fosforečnou zředěnou RS* na hodnotu pH 4,0, s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, pokud rozlišení mezi prvním píkem (klavulan) a druhým píkem (amoxicillin) je nejméně 3,5 a symetrie píku odpovídající

ho klavulanu je větší než 1,5. Šestkrát se nastříkne porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku klavulanu je menší než 1,0 %.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a).

1 mg $C_8H_9NO_5$ odpovídá 1,191 mg $C_8H_8KNO_5$.

Uchovávání

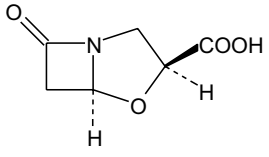
Ve vzduchotěsných obalech. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

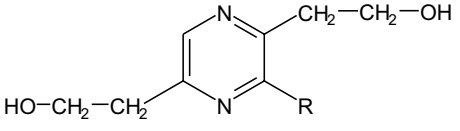
Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty



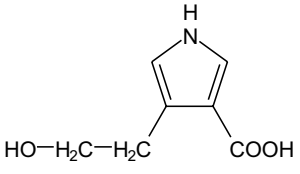
A. kyselina (3S,5S)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyklo[3,2,0]heptan-3-karboxylová,



B. R = H: pyrazin-2,5-diyl (diethanol),

C. R = CH_2CH_2COOH: kyselina 3-[3,6-bis(2-hydroxyethyl)pyrazin-2-yl]propionová,

D. R = CH_2CH_3: 3-ethylpyrazin-2,5-diyl (diethanol),



E. kyselina 4-(2-hydroxyethyl)pyrrol-3-karboxylová.

Kalii dihydrogenophosphas

Dihydrogenfosforečnan draselný

Synonymum. Kalium dihydrogenphosphoricum

KH_2PO_4 M_r 136,09 CAS 7778-77-0

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny KH_2PO_4.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je slabě kyselý *(2.2.4)*.

B. Roztok S vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

C. 0,5 ml roztoku S vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,2 až 4,5; měří se roztok připravený smícháním 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* s 5 ml roztoku S.

Redukující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a směs se 5 min zahřívá na vodní lázni; roztok se úplně neodbarví.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 5 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávací roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Sodík. Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků, vyhovuje následující zkoušce na sodík.

Nejvýše 0,1 % Na; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,5084 g *chloridu sodného R* předem sušeného 3 h při 100 °C až 105 °C se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml (200 μg Na/ml). Zředí se podle potřeby.

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 125 °C až 130 °C.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* prostým uhličitanů za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 0,1361 g KH_2PO_4.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků.

Kalii hydrogenocarbonas

Hydrogenuhličitan draselný

$KHCO_3$ M_r 100,12 CAS 298-14-6

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $KHCO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Zahřátím v suchém stavu nebo v roztoku přechází postupně na uhličitan draselný.

Zkoušky totožnosti

A. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* vznikne světle růžové zbarvení. Roztok se zahřeje; vyvíjí se plyn a zbarvení se mění na červené.

B. Vyhovuje zkoušce na uhličitany a hydrogenuhličitany *(2.3.1)*.

C. 1 ml roztoku S vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí v 90 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Uhličitany. Hodnota pH *(2.2.3)* čerstvě připraveného roztoku S je nejvýše 8,6.

Chloridy *(2.4.4)*. 7 ml roztoku S se zředí *kyselinou dusičnou zředěnou RS* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (150 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *kyselinou octovou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití směsi 7,5 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 7,5 ml *vody destilované R*.

Amonium *(2.4.1)*. 10 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na amonium (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití směsi 5 ml *vody R* a 10 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)*.

Vápník *(2.4.3)*. 10 ml roztoku S se zředí *kyselinou octovou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (100 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 5 ml základního *roztoku vápníku (10 μg Ca/ml)* a 10 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 18 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Sodík. Nejvýše 0,5 %; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)* zředěním dle potřeby *vodou R*.

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

Stanovení obsahu

0,800 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,1 ml *oranže methylové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na žlutavě růžové. Roztok se opatrně zahřeje a vaří nejméně 2 min; zbarvení roztoku se změní na žluté. Po ochlazení se znovu titruje do vzniku žlutočerveného zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 0,1001 g $KHCO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Kalii hydrogenophosphas

Hydrogenfosforečnan draselný

Synonymum. Dikalii phosphas

K_2HPO_4 M_r 174,18 CAS 7758-11-4

Počítáno na vysušenou látku obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny K_2HPO_4.

Vlastnosti

Bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je slabě zásaditý *(2.2.4)*.

B. Roztok S vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Redukující látky. Směs 5 ml roztoku S, 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* se zahřívá 5 min na vodní lázni; roztok zůstane slabě růžový.

Dihydrogenfosforečnan draselný. Z množství *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* (10,0 ml) a *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* (n_1 ml a n_2 ml) spotřebovaných při Stanovení obsahu se vypočte poměr:

$$\frac{n_2 - 10}{10 - n_1},$$

který není větší než 0,025 (2,5 %).

Chloridy *(2.4.4)*. Ke 2,5 ml roztoku S se přidá 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 1,5 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí v 8 ml *vody R*, okyselí se asi 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* (pH 3 až 4) a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Sodík. Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků, obsahuje nejvýše 0,1 % Na; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)* a podle potřeby se zředí *vodou R*.

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se zahřívá v sušárně při 125 °C až 130 °C.

Sterilita *(2.6.1)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1,1 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

0,800 g (*m*) se rozpustí ve 40 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*. Titruje se za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* k prvnímu inflexnímu bodu pH křivky (n_1 ml). Pokračuje se v titraci do druhého inflexního bodu křivky (celková spotřeba *hydroxidu sodného 1 mol/l VS*, n_2 ml).

Obsah K_2HPO_4 v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{1742 \,.\, (10 - n_1)}{m \,.\, (100 - d)} ,$$

v němž značí:
d - ztrátu sušením v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

† Kalii hydroxidum

Hydroxid draselný

KOH M_r 56,11 CAS 1310-58-3

Obsahuje 85 % až 100,5 % celkových alkálií, počítaných jako KOH.

Vlastnosti

Bílá krystalická tvrdá hmota ve formě tyčinek, čoček nebo nepravidelných kousků, rozplývající se na vzduchu a absorbující oxid uhličitý. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* (tento roztok se použije ve zkoušce B). 1 ml roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml. Hodnota pH *(2.2.3)* tohoto roztoku není menší než 10,5.

B. 1 ml roztoku připraveného ve zkoušce A vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 2,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Opatrně za chlazení se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *kyselinou dusičnou zředěnou RS* na 25 ml.

Roztok S2. 10 g se rozpustí v 15 ml *vody destilované R*. Opatrně za chlazení se přidá 12 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 50 ml.

Vzhled roztoku. 5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Uhličitany. Nejvýše 2,0 %; počítáno jako K_2CO_3, viz Stanovení obsahu.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S1 zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Fosforečnany *(2.4.11)*. 5 ml roztoku S1 zředěného *vodou R* na 100 ml vyhovuje limitní zkoušce na fosforečnany (20 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S2 vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena k výrobě hemodialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník. 20 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,2 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Jako kontrolní roztok se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S2 se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S2 zředěného na 10 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Sodík. Nejvýše 1,0 %; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny sírové R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. K přípravě se použije základní *roztok sodíku* (200 μg Na/ml) a podle potřeby se zředí *vodou R*.

Měří se absorbance při 589 nm za použití sodíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí v 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 25 ml čerstvě připraveného *chloridu barnatého RS1* a 0,3 ml *fenolftaleinu RS*. Pomalu za třepání se přidá 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a pokračuje se v titraci *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* až do odbarvení růžového roztoku. Přidá se 0,3 ml *modře bromfenolové RS* a pokračuje se v titraci *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* až do změny zbarvení z fialovomodrého na žluté.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* použité v druhé části titrace odpovídá 69,11 mg K_2CO_3,

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* použité ve spojených titracích odpovídá 56,11 mg celkových alkálií, počítaných jako KOH.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných nekovových obalech.
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu hemodialyzačních roztoků.

Kalii iodidum

Jodid draselný

Synonymum. Kalium iodatum

KI M_r 166,00 CAS 7681-11-0

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny KI.

Vlastnosti

Bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v glycerolu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na jodidy *(2.3.1)*.

B. Roztok S vyhovuje zkoušce na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se na 100 ml stejným rozpouštědlem.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. K 12,5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Jodičnany. K 10 ml roztoku S se přidá 0,25 ml *škrobu prostého jodidu RS*, 0,2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a nechá se stát 2 min chráněn před světlem; nevznikne žádné modré zbarvení.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Thiosírany. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *škrobu RS* a 0,1 ml *jodu 0,005 mol/l VS;* vznikne modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,00 g rozetřené látky se 3 h suší při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

1,500 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Ke 20,0 ml tohoto roztoku se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS* do změny červeného zbarvení na žluté. Přidá se 5 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za intenzivního protřepávání až do odbarvení chloroformové vrstvy.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 16,60 mg KI.

Uchovávání

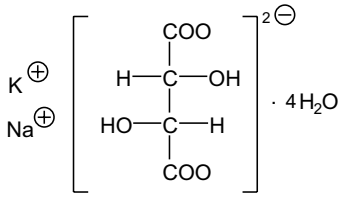
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Kalii natrii tartras

N

Vínan draselno-sodný

Synonymum. Kalium natrium tartaricum



$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ M_r 282,22 CAS 6100-16-9

Je to tetrahydrát draselno-sodné soli kyseliny (+)-(2*R*,3*R*)-2,3-dihydroxyjantarové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_4KNaO_6$.

Vlastnosti

Bezbarvé průsvitné krystaly nebo bílý krystalický prášek. Na vzduchu ztrácí část krystalické vody. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a prakticky nerozpustný v lihu 96 %.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Vyhovuje zkoušce (b) na draslík (*2.3.1*).

C. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na vínan (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +28,0° až +30,0°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Chloridy (*2.4.4*). 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Sírany (*2.4.13*). 1,0 g zkoušené látky se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 5 ml základního *roztoku síranů* (*10 μg* SO_4/ml) a zředí se *vodou R* na 15 ml.

Amonium (*2.4.1*). 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na amonium (40 μg/g).

Arsen (*2.4.2*). 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml*).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12*). 24,0 % až 26,5 %; stanoví se s 50,0 mg jemně rozetřené zkoušené látky, která se rozpustí v 50 ml *methanolu bezvodého R* a pomalu se titruje.

Stanovení obsahu

25,0 mg jemně rozetřené zkoušené látky se rozpustí v 40 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 20 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Před koncem titrace se titruje velmi pomalu.

1 ml *kyseliny chloristé 0,02 mol/l VS* odpovídá 2,102 mg $C_4H_4KNaO_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Kalii nitras

N

Dusičnan draselný

Synonymum. Kalium nitricum

KNO_3 M_r 101,10 CAS 7757-79-1

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny KNO_3.

Vlastnosti

Bezbarvé krystaly nebo bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný ve vroucí vodě a velmi těžce rozpustný v lihu 96 %.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 5 mg vyhovuje zkoušce na dusičnany (*2.3.1*).

B. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (b) na draslík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně.

Chloridy (*2.4.4*). 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (20 μg/g).

Jodičnany, dusitany. K 10 ml roztoku S se přidá 0,04 ml *jodidu draselného RS*, 1 ml *chloroformu R,* 2 ml *kyseliny octové ledové R* a silně se protřepe; do 5 min se chloroformová vrstva nezbarví.

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Amonium (*2.4.1*). 1 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na *amonium* (100 μg/g).

Sodík. K 1 ml roztoku S se přidá 1 ml *vody R,* 2 ml roztoku *uhličitanu draselného R* (100 g/l) a zahřeje se; roztok je čirý. Potom se přidají 4 ml *hexahydroxoantimoničnanu draselného RS* a znovu se zahřeje; do 15 min nevzniknou krystaly nebo bílá krystalická sraženina.

Těžké kovy (*2.4.8*). 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 12 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml*).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g rozetřené látky se suší v sušárně při 120 °C. Vysušená látka se použije ke Stanovení obsahu.

Stanovení obsahu

80,0 mg vysušené látky se smíchá ve 100ml kádince se 2 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R.* Směs se mírně zahřeje a únik plynných reakčních zplodin se podpoří promícháváním a nakláněním kádinky. Po ukončení reakce se směs zředí 5 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *chloroformu R,* 0,04 ml *violeti krystalové RS*, promíchá se a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS.* Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,11 g KNO_3.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Kalii perchloras

N

Chloristan draselný

Synonymum. Kalium perchloricum

$KClO_4$ M_r 138,55 CAS 7778-74-7

Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $KClO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v horké vodě a prakticky nerozpustný v lihu 96 %.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 0,2 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok se použije také ke zkoušce B. K polovině roztoku se přidá roztok *modři methylenové R* (5 g/l); vznikne fialová krystalická sraženina.

B. K druhé polovině roztoku ze zkoušky A se přidá 5 ml *indigokarmínu RS* a zahřeje se k varu; roztok se neodbarví.

C. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,5 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se jí zředí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně.

Chloridy (*2.4.4*). 0,5 g zkoušené látky se rozpustí zahřátím ve vodě a po ochlazení se jí zředí na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Chlorečnany. 0,1 g se smíchá s 1,0 ml *kyseliny sírové R;* směs se nezbarví žlutě.

Sírany *(2.4.13)*. 1,50 g se rozpustí zahřátím ve *vodě R* a po ochlazení se jí zředí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Sodík. K 5 ml roztoku S se přidají 2 ml roztoku *uhličitanu draselného R* (100 g/l) a zahřeje se; roztok je čirý. Potom se přidají 4 ml *hexahydroxoantimoničnanu draselného RS* a znovu se zahřeje; do 15 min nevzniknou krystaly nebo bílá krystalická sraženina.

Těžké kovy (*2.4.8*). 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Vápník *(2.4.3)*. 1,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě destilované R* a po ochlazení se jí zředí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (100 μg/g).

Stanovení obsahu

0,100 g se v platinovém kelímku dobře promísí se 7,0 g mořského písku, směs se převrství ještě asi s 3 g tohoto písku a žíhá se 10 minut v elektrické peci při (700 ± 50) °C. Po vychladnutí se obsah kelímku promyje opakovanou dekantací asi se 100 ml *vody R* a tekutina se zfiltruje. Filtráty se spojí, přidá se 5,0 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,86 mg $KClO_4$

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Kalii permanganas

Manganistan draselný

Synonymum. Kalium permanganicum

$KMnO_4$ M_r 158,03 CAS 7722-64-7

Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $KMnO_4$.

Vlastnosti

Tmavě červenofialový nebo hnědočerný granulovaný prášek nebo tmavě červenofialové až téměř černé krystaly, většinou kovově lesklé. Je dobře rozpustný ve studené vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě. Stykem s některými organickými látkami se rozkládá.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *lihu 96% R* a 0,3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* roztok se zbarví zeleně. Po zahřátí k varu se vyloučí tmavě hnědá sraženina.

B. Vzniklá směs ze zkoušky A se zfiltruje. Filtrát vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,75 g se rozpustí ve 25 ml *vody destilované R*, přidají se 3 ml *lihu 96% R* a 2 min až 3 min se povaří. Po ochlazení se zředí *vodou destilovanou R* na 30 ml a zfiltruje se.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Látky nerozpustné ve vodě. 0,5 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a zahřeje se k varu. Roztok se zfiltruje zváženým filtrem ze slinutého skla (16). Promývá se *vodou R*, až je filtrát bezbarvý. Zbytek na filtru vysušený v sušárně při 100 °C až 105 °C váží nejvýše 5 mg (1,0 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 12 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g).

Stanovení obsahu

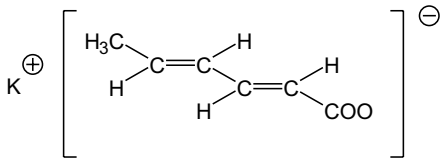
0,300 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 20,0 ml tohoto roztoku se přidá 20 ml *vody R*, 1 g *jodidu draselného R* a 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Uvolněný jod se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,160 mg $KMnO_4$.

Kalii sorbas

Sorbitan draselný

Synonymum. Kalium sorbatum



$C_6H_7KO_2$ M_r 150,22 CAS 590-00-1

Je to draselná sůl kyseliny (*E*,*E*)-2,4-hexadienové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_7KO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo granule. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 250,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 200,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 264 nm. Specifická absorbance v maximu je 1650 až 1900.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sorbitanu draselného CRL*.

C. 1,0 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepe se. Krystalická sraženina se odfiltruje, promyje *vodou R* a suší se 4 h ve vakuu nad *kyselinou sírovou R*. Taje *(2.2.14)* při 132 °C až 136 °C.

D. 0,2 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje zkoušce (b) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 20 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* nebo 0,25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*.

Aldehydy. 1,0 g se rozpustí ve směsi 30 ml *vody R* a 50 ml *2-propanolu R*. *Kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* se upraví pH na hodnotu 4 a zředí se *vodou R* na 100 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *fuchsinu RS* a nechá se 30 min stát. Roztok se nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně přidáním 1 ml *fuchsinu RS* ke směsi 1,5 ml základního *roztoku acetaldehydu (100 μg C_2H_4O/ml)*, 4 ml *2-propanolu R* a 4,5 ml *vody R* (0,15 %, počítáno jako C_2H_4O).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,120 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru do změny fialového zbarvení na modrozelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,02 mg $C_6H_7KO_2$.

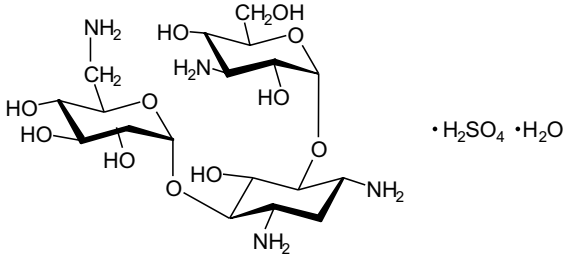
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Kanamycini monosulfas

Kanamyciniummonosulfat

Synonyma. Kanamycini sulfas, Kanamycinium sulfuricum



$C_{18}H_{38}N_4O_{15}S \cdot H_2O$ M_r 600,59 CAS 25389-94-0

M_r bezvodého 582,58

Je to monohydrát 6-O-(3-amino-3-deoxy-α-D-glukopyranosyl)-4-O-(6-amino-6-deoxy-α-D-glukopyranosyl)-2-deoxy-D-streptamonium-sulfatu, antibiotikum produkované při růstu určitých kmenů *Streptomyces kanamyceticus*. Účinnost je nejméně 750 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Výroba

Připravuje se výrobními postupy, které vylučují nebo omezují přítomnost látek snižujících krevní tlak. Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li látka zkoušena, vyhoví následující zkoušce:

Neškodnost (*2.6.9*). Každé myši se vstříkne 0,5 ml roztoku obsahujícího v mililitru 2 mg zkoušené látky.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je rozpustný v asi 8 dílech vody, prakticky nerozpustný v acetonu, v etheru a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy silné 0,75 mm připravené následovně: 0,3 g *karbomeru R* se smíchá s 240 ml *vody R* a nechá se 1 h stát za mírného protřepávání. Postupným přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS* za stálého třepání se upraví pH na 7 a přidá se 30 g *silikagelu H R*.

Deska s vrstvou se 1 h zahřívá při 110 °C, nechá se zchladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *kanamyciniummonosulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *kanamyciniummonosulfatu CRL*, 10 mg *neomyciniumsulfatu CRL* a 10 mg *streptomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl z každého roztoku a vyvíjí se roztokem *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (70 g/l) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, postříká se směsí stejných objemů roztoku *1,3-dihydroxynaftalenu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *kyseliny sírové R* (460 g/l) a zahřívá se 5 min až 10 min při 150 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 10 ml *trinitrofenolu RS*. Je-li třeba, vyvolá se krystalizace třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky a nechá se stát. Krystaly se shromáždí, promyjí 20 ml *vody R*, odfiltrují se a suší při 100 °C. Krystaly tají (*2.2.14*) při asi 235 °C, za rozkladu.

C. Asi 50 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Přidá se 1 ml roztoku *ninhydrinu R* (10 g/l) a zahřívá se několik minut na vodní lázni; vzniká fialové zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 8,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +112° až +123°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Kanamycin B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy, jejíž příprava je popsána ve Zkoušce totožnosti A. Deska s vrstvou se 1 h zahřívá při 110 °C, nechá se vychladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.
Porovnávací roztok. 4 mg *kanamyciniummonosulfatu B CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 4 µl z každého roztoku a vyvíjí se roztokem *dihydrofosforečnanu draselného R* (70 g/l) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se *zkoumadlem ninhydrinovým s chloridem cínatým R*. Vrstva se 15 min zahřívá při 110 °C. Skvrna odpovídající kanamycinu B na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,5 %; 1,00 g se 3 h suší při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sírany. 15,0 % až 17,0 % síranů (SO_4), počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a pH roztoku se upraví *amoniakem 26% RS* na 11. Přidá se 10,0 ml roztoku *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *červeni ftaleinové R*. Titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se barva roztoku začíná měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud fialovo-modré zbarvení nezmizí.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne 1 ml roztoku zkoušené látky (10 mg/ml) ve *vodě na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

† Kanamycini sulfas acidus

Kyselý kanamyciniumsulfat

CAS 64013-70-3

Je to forma kanamyciniumsulfatu připravená přidáním kyseliny sírové k roztoku kanamyciniummonosulfatu a vysušením tohoto roztoku vhodnou metodou. Účinnost je nejméně 670 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Výroba

Připravuje se výrobními postupy, které vylučují nebo omezují přítomnost látek snižujících krevní tlak. Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li látka zkoušena, vyhoví následující zkoušce:

Neškodnost (*2.6.9*). Každé myši se vstříkne 0,5 ml roztoku, obsahujícího v mililitru 2 mg zkoušené látky.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický krystalický prášek. Je rozpustný v asi 1 dílu vody, prakticky nerozpustný v acetonu, v etheru a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy silné 0,75 mm, připravené následovně: 0,3 g *karbomeru R* se smíchá s 240 ml *vody R* a nechá se 1 h stát za mírného protřepávání. Postupným přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS* za stálého třepání se upraví pH na hodnotu 7 a přidá se 30 g *silikagelu H R*.

Deska s vrstvou se 1 h zahřívá při 110 °C, nechá se zchladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *kanamyciniummonosulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kanamyciniummonosulfatu CRL*, 10 mg *neomyciniumsulfatu CRL* a 10 mg *streptomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl z každého roztoku a vyvíjí se roztokem *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (70 g/l) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, postříká se směsí stejných objemů roztoku *1,3-dihydroxynaftalenu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *kyseliny sírové R* (460 g/l) a zahřívá se 5 min až 10 min při 150 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně oddělené skvrny.

B. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 10 ml *trinitrofenolu RS*. Je-li třeba, vyvolá se krystalizace třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky a nechá se stát. Krystaly se shromáždí, promyjí 20 ml *vody R*, odfiltrují se a suší při 100 °C. Krystaly tají (*2.2.14*) při asi 235 °C, za rozkladu.

C. Asi 50 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Přidá se 1 ml roztoku *ninhydrinu R* (10 g/l) a zahřívá se několik minut na vodní lázni. Vznikne fialové zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5. Měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +103° až +115°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Kanamycin B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy, jejíž příprava je popsána ve Zkoušce totožnosti A. Deska s vrstvou se 1 h zahřívá při 110 °C, nechá se vychladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. 0,11 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.
Porovnávací roztok. 4 mg *kanamyciniummonosulfatu B CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 4 µl z každého roztoku a vyvíjí se roztokem *dihydrofosforečnanu draselného R* (70 g/l) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se *zkoumadlem ninhydrinovým s chloridem cínatým R*. Vrstva se 15 min zahřívá při 110 °C. Skvrna odpovídající kanamycinu B na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (4,0 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,00 g se 3 h suší při 60 °C při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sírany. 23,0 % až 26,0 % síranů (SO_4), počítáno na vysušenou látku. 0,175 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a pH roztoku se upraví *amoniakem 26% RS* na hodnotu 11. Přidá se 10,0 ml roztoku *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *červeni ftaleinové R*. Titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se barva roztoku začíná měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud fialovo-modré zbarvení nezmizí.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne 1 ml roztoku zkoušené látky (10 mg/ml) ve *vodě na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*). Jako referenční látka se použije *kanamyciniummonosulfat CRL*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

Kaolinum ponderosum

Těžký kaolin

CAS 1332-58-7

Je to čištěný přírodní hydratovaný křemičitan hlinitý proměnlivého složení.

Vlastnosti

Jemný bílý nebo šedavě bílý mastný prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,5 g v kovovém kelímku se přidá 1 g *dusičnanu draselného R* a 3 g *uhličitanu sodného R* a zahřívá se, až směs roztaje. Po ochlazení se ke zbytku přidá 20 ml vroucí *vody R*, promíchá se a zfiltruje. Nerozpustný zbytek se promyje 50 ml *vody R*. Ke zbytku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 5 ml *vody R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a opět se zfiltruje. K filtrátu se přidají 3 ml *chloridu amonného RS;* vznikne bílá gelovitá sraženina.

B. 2,0 g se rozdělí na dvacet částí, které se postupně v dvouminutových intervalech přidávají ke 100 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (10 g/l) do děleného válce o průměru asi 30 mm; směs se nechá 2 h stát. Zjevný objem sedimentu není větší než 5 ml.

C. 0,25 g vyhovuje zkoušce na křemičitany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Ke 4 g se přidá směs 6 ml *kyseliny octové R* a 34 ml *vody destilované R*, 1 min se třepe a zfiltruje se.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 1,0 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 2 min se třepe a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke vzniku růžového zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Organické nečistoty. 0,3 g se žíhá do červena v žíhací trubičce. Zbytek po žíhání je pouze nepatrně více zbarven než původní látka.

Adsorpční mohutnost. K 1,0 g ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 10,0 ml roztoku *modři methylenové R* (3,7 g/l), 2 min se třepe a nechá se usadit. Odstřeďuje se a roztok se zředí 1 : 100 *vodou R*. Roztok není intenzivněji zbarven než roztok *modři methylenové R* (0,03 g/l).

Bobtnavost. 2 g se rozetřou s 2 ml *vody R;* směs se nerozteče.

Látky rozpustné v minerálních kyselinách. K 5,0 g se přidá 7,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 27,5 ml *vody R* a 5 min se vaří. Směs se zfiltruje a zbytek se promyje na filtru *vodou R*. Spojené filtráty a promývací tekutina se spojí a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, odpaří se do sucha na vodní lázni a vyžíhá se; zbytek váží nejvýše 10 mg (1 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (250 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Vápník *(2.4.3)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (250 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 5 ml roztoku připraveného ve zkoušce Látky rozpustné v minerálních kyselinách se přidá 5 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 25 ml *isobutylmethylketonu R* a 2 min se třepe. Po oddělení vrstev se vodná vrstva odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R*, zředí se *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Pokud je látka určena k vnitřnímu použití, vyhovuje požadavkům článku s následující upravenou zkouškou na těžké kovy.

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 10 ml roztoku připraveného ve zkoušce Látky rozpustné v minerálních kyselinách se přidá 10 ml *vody R*, 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 25 ml *isobutylmethylketonu R* a 2 min se třepe. Po oddělení vrstev se vodná vrstva odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R*, zředí se *vodou R* na 25 ml a zfiltruje se. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (25 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

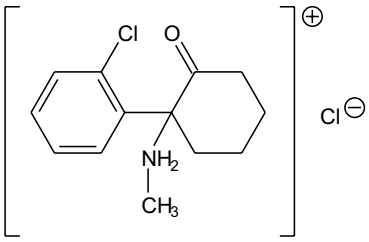
Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka určena k vnitřnímu použití.

† Ketamini hydrochloridum

Ketaminiumchlorid



$C_{13}H_{17}Cl_2NO$ M_r 274,19 CAS 1867-66-9

Je to (*RS*)-[2-(2-chlorfenyl)-1-oxo-2-cyklohexyl]methylamoniumchlorid. Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{17}Cl_2NO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 260 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. ketaminiumchloridu.*

B. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 4,1; měří se 10 ml roztoku S zředěného *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *ketaminu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi (je-li třeba za použití ultrazvuku) a zředí se jí na 50,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 100,0 ml. Připravuje se v čas potřeby.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4,0 mm a nerezové předkolony délky 4 mm a vnitřního průměru 4,0 mm, naplněných sférickým *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze připravené následujícím způsobem: 0,95 g *hexansulfonatu sodného R* se rozpustí v 1 l směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (25 + 75) a přidají se 4 ml *kyseliny octové R*. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 215 nm.

Nastříkne se odděleně po 20 µl každého roztoku. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající desetinásobku retenčního času ketaminu.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení píků ketaminu nečistoty A a ketaminu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 1,5. V případě potřeby se upraví koncentrace vody a acetonitrilu v mobilní fázi.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než je 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8).* 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 µg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50 ml *methanolu R* a přidá se 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

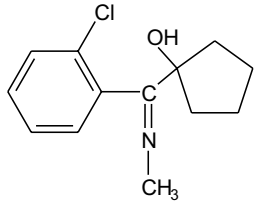
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,42 mg $C_{13}H_{17}Cl_2NO$.

Uchovávání

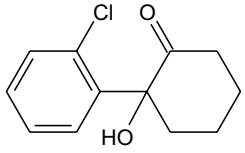
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

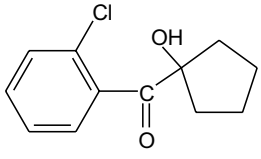
Nečistoty



A. 1-[(2-chlorfenyl)(methylimino)methyl]cyklopentanol,



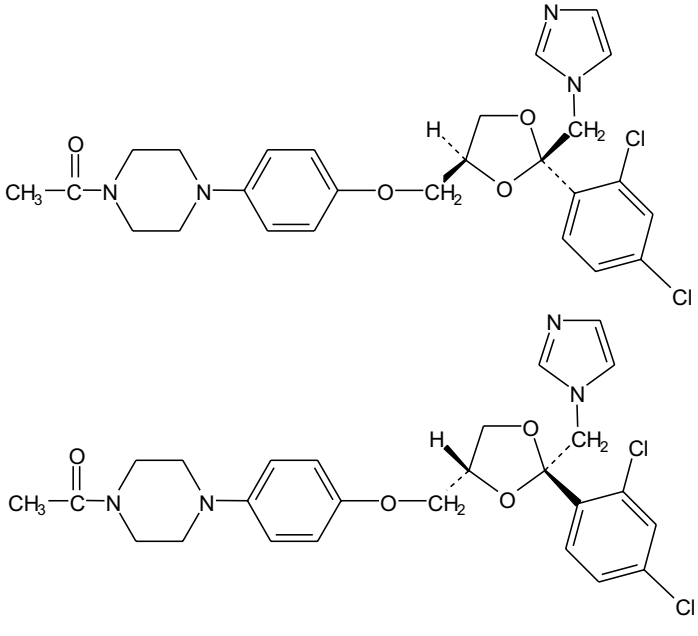
B. 2-(2-chlorfenyl)-2-hydroxycyklohexanon,



C. 2-chlorfenyl-1-hydroxycyklopentylketon.

† Ketoconazolum

Ketokonazol



$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ M_r 531,44 CAS 65277-42-1

Je to (±)-*cis*-1-acetyl-4-[4-[[2-(2-4-dichlorofenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]-methoxy]fenyl]piperazin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 148 °C až 152 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ketokonazolu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *ketokonazolu CRL* se rozpustí v mobilní fázi zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *ketokonazolu CRL* a 30 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu a potom se vystaví působení par jodu do vzniku skvrn. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou, zbarvením a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K asi 30 mg se v porcelánovém kelímku přidá 0,3 g *uhličitanu sodného bezvodého R,* zahřívá se 10 min nad plamenem a nechá se vychladnout. Zbytek se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_4$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,10° až +0,10°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *ketokonazolu CRL* a 2,5 mg *loperamidiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 μm),

- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (3,4 g/l) (0,5 + 9,5). Složení směsi se mění lineární gradientovou elucí během 10 min tak, aby konečné složení směsi bylo 5 objemových dílů *acetonitrilu R* a 5 objemových dílů roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (3,4 g/l); následuje eluce konečnou směsí po dobu 5 min. Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Kolona sa ustaluje nejméně 30 min promýváním *acetonitrilem R* a potom se nejméně 5 min ustaluje počáteční mobilní fází.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: ketokonazolu asi 6 min, loperamidiumchloridu asi 8 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem ketokonazolu a píkem loperamidiumchloridu není menší než 15. Je-li třeba, upraví se konečná koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi nebo se upraví časový program lineární gradientové eluce.

Nastříkne se 10 µl methanolu jako kontrolní kapaliny, 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům získaným u kontrolní tekutiny a k píkům s plochou menší, než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztok se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 70 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,57 mg $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. (±)-*cis*-1-acetyl-4-{4-[2-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxyfenyl}-1,2,3,4-tetrahydropyrazin,

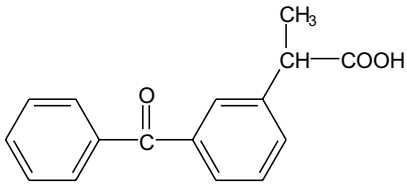
B. (±)-*cis*-1-acetyl-4-{4-[5-(4-acetyl-1-piperazinyl)-2-{[2-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxyfenoxyfenyl}piperazin,

C. (±)-*trans*-1-acetyl-4-{4-[2-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]-methoxyfenyl}piperazin,

D. (±)-*cis*-1-{4-[2-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxyfenyl}piperazin.

† Ketoprofenum

Ketoprofen



$C_{16}H_{14}O_3$ M_r 254,28 CAS 22071-15-4

Je to kyselina (*RS*)-2-(3-benzoylfenyl)propionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{14}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 94 °C až 97 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 255 nm. Specifická absorbance v maximu je 615 až 680.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ketoprofenu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *ketoprofenu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *indometacinu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *dichlormethanu R* a *acetonu R* (1 + 49 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *ketoprofenu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *ketoprofenu nečistoty C CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (b).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) se specifickým povrchem 350 $m^2.g^{-1}$ a velikostí pórů 0,01 µm (10 nm),
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: smíchají se objemové díly *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 3,5*, *acetonitrilu R* a *vody R* (2 + 43 + 55). Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 233 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (d); látky se eluují v následujícím pořadí: ketoprofen a ketoprofen nečistota A. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky dvou hlavních píků nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím ketoprofenu a píkem odpovídajícím ketoprofenu nečistotě A je nejméně 7,0.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a), 20 µl porovnávacího roztoku (b) a 20 µl porovnávacího roztoku (c). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 7násobku retenčního času ketoprofenu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího ketoprofenu nečistotě A a ketoprofenu nečistotě C větší než plochy hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) (0,2 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píků odpovídajících ketoprofenu nečistotě A a ketoprofenu nečistotě B, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a ploch jmenovaných dvou nečistot, není větší než dvojnásobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,4 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší, než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší při 60 °C a při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

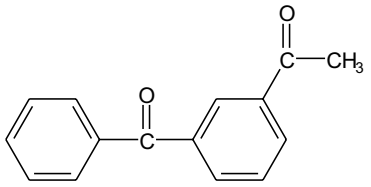
0,200 g se rozpustí v 25 ml *lihu 96% R*, přidá se 25 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,43 mg $C_{16}H_{14}O_3$.

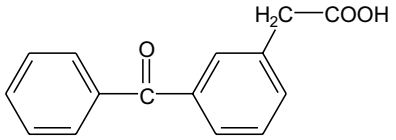
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

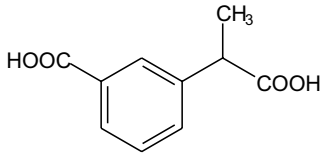
Nečistoty



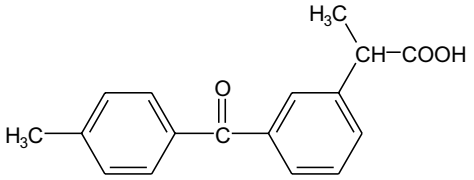
A. 3-acetylbenzofenon,



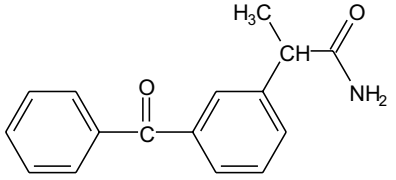
B. kyselina 2-(3-benzoylfenyl)octová,



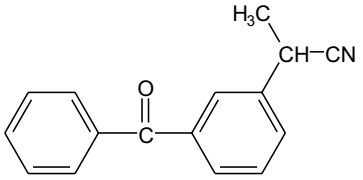
C. kyselina 2-(3-karboxyfenyl)propionová,



D. kyselina 2-[3-(4-methylbenzoyl)fenyl]propionová,



E. 2-(3-benzoylfenyl)propionamid,



F. 2-(3-benzoylfenyl)propiononitril.

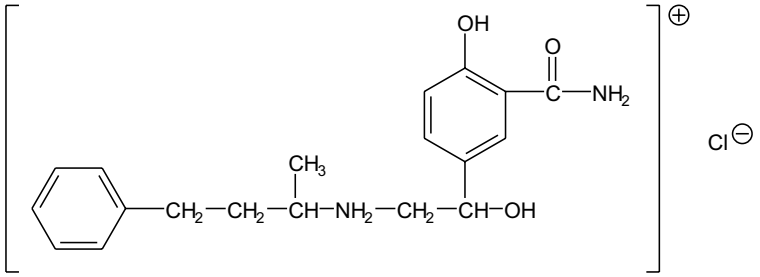
1994

† Labetaloli hydrochloridum

1998

Labetaloliumchlorid

Synonymum. Labetalolium chloratum



$C_{19}H_{25}ClN_2O_3$ M_r 364,87 CAS 32780-64-6

Je to N-{[2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-karbamoyl)fenyl]ethyl}-N-(4-fenyl-2-butyl)amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{25}ClN_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Optická otáčivost *(2.2.7)* +0,05° až -0,05°; měří se roztok S, viz Zkoušky na čistotu.

B. 25,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 250,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm (*2.2.25*). Roztok vykazuje absorpční maximum při 302 nm. Specifická absorbance v maximu je 83 až 88.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *labetaloliumchloridu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R*.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *labetaloliumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R*.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *labetaloliumchloridu CRL* a 10 mg *propranololiumchloridu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a deska se umístí do chromatografické komory ihned po přidání mobilní fáze obsahující směs objemových dílů *kyseliny chloristé R*, *vody R* a *methanolu R* (0,5 + 50 + 80). Vyvíjí se po uzavření komory po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromato

gramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml. Použije se čerstvě připravený roztok.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než stupeň 6 nejpodobnějšího porovnávacího barevného roztoku *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,0; měří se roztok S.

Poměr diastereoizomerů. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 2,0 mg se rozpustí v 1,0 ml roztoku *kyseliny butylborité R* (12,0 g/l) v *pyridinu bezvodém R* a nechá se 20 min stát.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (125 μm až 150 μm), impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony, nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 300 °C.

Nastříkne se odděleně po 2 μl každého roztoku. Na chromatogramu se objeví dva píky odpovídající páru diastereoizomerů. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška vyššího píku diastereomeru byla asi 80 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška minima mezi dvěma píky je menší než 5 % celé stupnice zapisovače. Plocha každého píku je 45 % až 55 % celkové plochy obou píků.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok směsi 150 ml *tetrahydrofuranu R*, 300 ml *methanolu R*, 550 ml *vody R*, 0,82 g *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R*, 1 g *oktylhydrogensíranu sodného R* a 10 ml *kyseliny sírové R* 10% (*V/V*), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 229 nm.

Kolona se ustaluje asi 30 min průtokem mobilní fáze 1 ml/min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Když jsou chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, je retenční čas hlavního píku 10 min až 15 min. Je-li třeba, upraví se obsah vody v mobilní fázi, ale poměr obsahu methanolu k obsahu tetrahydrofuranu se udržuje na 2 : 1.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,6násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,3 %). Součet ploch všech píků není větší než plocha

hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C a při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Aby se zabránilo přehřátí, reakční směs se důkladně míchá po celou dobu stanovení a titrace se přeruší okamžitě, jakmile bylo dosaženo bodu ekvivalence.

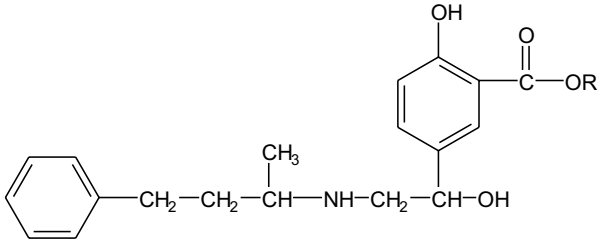
0,200 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *acetanhydridu R* (10 + 40) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,49 mg $C_{19}H_{25}ClN_2O_3$.

Uchovávání

Separandum.

Nečistoty



A. R = H; kyselina 2-hydroxy-5-{1-hydroxy-2-[(1-methyl-3-fenylpropyl)amino]ethyl}benzoová,

B. R = CH_3; methyl-2-hydroxy-5-{1-hydroxy-2-[(1-methyl-3-fenylpropyl)amino]ethy}benzoat.

Lacca

Šelak

Synonymum. Resina lacca

Je to čištěná látka získaná z pryskyřičného výměšku hmyzích samic druhu *Kerria lacca* (KERR) LINDINGER (*Laccifer lacca* KERR). V závislosti na způsobu zpracování matečného výměšku se rozlišují čtyři typy šelaku: šelak obsahující vosk, šelak bělený, šelak zbavený vosku a šelak bělený zbavený vosku.

Šelak obsahující vosk se získává z matečného výměšku filtrací roztavené látky nebo extrakcí vhodným rozpouštědlem za horka.

Šelak bělený se získává z matečného výměšku rozpuštěného ve vhodném alkalickém roztoku pomocí chlornanu sodného vysrážením zředěnou kyselinou a sušením.

Šelak zbavený vosku se získává ze šelaku obsahujícího vosk nebo z matečného výměšku pomocí vhodného rozpouštědla a následnou filtrací.

Šelak bělený zbavený vosku se získává ze šelaku obsahujícího vosk nebo z matečného výměšku rozpuštěného ve vhodném alkalickém roztoku pomocí chlornanu sodného a nerozpustný vosk se odstraní filtrací. Vysráží se zředěnou kyselinou a usuší se.

Vlastnosti

Jsou to hnědooranžové nebo žluté lesklé průsvitné tvrdé nebo křehké, více nebo méně silné vločky (šelak obsahující vosk, šelak zbavený vosku) nebo krémově bílý nebo nahnědle žlutý prášek (šelak bělený, šelak bělený zbavený vosku).

Je prakticky nerozpustný ve vodě, částečně rozpustný v etheru. V ethanolu se rozpouští na více nebo méně opalizující roztok (šelak obsahující vosk, šelak bělený) nebo na čirý roztok (šelak zbavený vosku, šelak bělený zbavený vosku).

Za horka je mírně rozpustný nebo dobře rozpustný v alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenční přísadou pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,25 g práškované drogy (500) se smíchá se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 5 ml *ethylacetatu R* a pomalu za stálého míchání se přidají 2 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Směs se protřepe a horní vrstva se zfiltruje přes *síran sodný bezvodý R*.

Porovnávací roztok. 6,0 mg *kyseliny aleuritové R* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 1,0 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se dvakrát směsí objemových dílů *kyseliny octové R, methanolu R, dichlormethanu a ethylacetatu R* (1 + 8 + + 32 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik barevných skvrn, z nichž jedna odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Nad touto skvrnou je několik fialově zbarvených skvrn a nad nimi růžově zbarvená skvrna. Pod skvrnou kyseliny aleuritové na chromato-

gramu zkoušeného roztoku je světle modrá skvrna (kyselina šellolová) a další stejně zbarvené, ale méně intenzivní skvrny. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další našedlé a nafialovělé skvrny.

B. Zkouška Kalafuna, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Šelak obsahující vosk. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna více nebo méně intenzivní namodrale šedá skvrna v poloze těsně nad skvrnou thymolftaleinu získanou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Šelak zbavený vosku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrna žádná namodrale šedá skvrna v poloze těsně nad skvrnou thymolftaleinu získanou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Kalafuna. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* způsobem uvedeným ve zkoušce totožnosti A s následujícími změnami.

Zkoušený roztok. 50 mg práškované drogy (500) se rozpustí za horka ve směsi složené z 0,5 ml *dichlormethanu R* a 0,5 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok. 2,0 mg *thymolftaleinu R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R.*

Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídající hodnotou R_F skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku se označí. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna (thymolftalein) na chromatogramu porovnávacího roztoku je zbarvena červenofialově. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná ze skvrn zhášejících fluorescenci s hodnotou R_F odpovídající skvrně thymolftaleinu na chromatogramu porovnávacího roztoku není zbarvena intenzivně fialově nebo nahnědle (kalafuna). Nepřihlíží se k žádné slabě nafialovělé skvrně v této poloze, která nezháší fluorescenci před postřikem a zahřátím.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. 65 až 95, počítáno na vysušenou látku. Stanoví se s 1,00 g hrubě mleté drogy za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

Arsen *(2.4.2)*. 0,33 g se ve spalovací baňce smíchá s 5 ml *kyseliny sírové R,* opatrně se přidá několik mililitrů *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a zahřívá se k varu, dokud se nezíská čirý a bezbarvý roztok. Pokračuje se v zahřívání až do odstranění vody a dle možností i kyseliny sírové a pak se zředí *vodou R* na 25 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (3 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 % (šelak nebělený) a nejvýše 6,0 % (šelak bělený). 1,000 g práškované drogy (500) se suší 24 h v sušárně při 40 °C až 45 ° C.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem. Šelak bělený a šelak bělený zbavený vosku se uchovávají při teplotě nejvýše 15 °C.

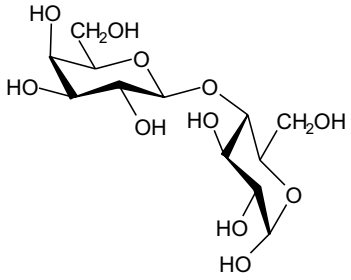
Označování

V označení na obalu se uvede typ šelaku.

Lactosum

Laktosa

Synonymum. Lactosum anhydricum



$C_{12}H_{22}O_{11}$ M_r 342,30 CAS 63-42-3

Je to O-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosa nebo směs O-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-α-D-glukopyranosy a O-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosy.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno, ale pomalu rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *laktosy CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *laktosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL,* 10 mg *fruktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené body se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla musí být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *lihu 96% R* (5 + 95) a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkouše-

ného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

C. 0,25 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 5 ml *amoniaku* 17,5% *RS* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 80 °C; vzniká červené zbarvení.

D. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí zahřátím při 50 °C ve *vodě R,* zředí se jí na 10 ml a nechá se ochladit. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 6,0 g se povařením rozpustí v 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, ochladí se a přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +54,4° až +55,9°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený takto: 10,0 g se rozpustí zahřátím na 50 °C v 80 ml *vody R,* nechá se ochladit a smíchá se s 0,2 ml *amoniaku zředěného RS1*. 30 min se nechá stát a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Absorbance *(2.2.25).* 1,0 g se rozpustí ve vroucí *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml (roztok A). Absorbance roztoku měřená při 400 nm není větší než 0,04. 1,0 ml roztoku A se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Měří se absorbance roztoku při 210 nm až 300 nm. Při vlnových délkách 210 nm až 220 nm není absorbance vyšší než 0,25. Při vlnových délkách 270 nm až 300 nm není absorbance vyšší než 0,07.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (10 g Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky za použití směsi objemových dílů *formamidu R* a *methanolu R* (1 + 2) jako rozpouštědla.

Síranový popel. Nejvýše 0,1 %; k 1,00 g se přidá 1 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12).* Nejvýše 10^2 aerobních mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce *(2.6.13)* na nepřítomnost *Escherichia coli.*

α-laktosa a β-laktosa. *Tato zkouška, týkající se farmaceuticko-technologických vlastností, může být provedena v závislosti na zamýšleném použití. Zkouška není závazná.*

Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,1 mg zkoušené látky se rozpustí ve 225 μl směsi objemových dílů *dimethylsulfoxidu R, N-(trimethylsilyl)imidazolu R a pyridinu bezvodého R* (19,5 + 22 + 58,5), opatrně se promíchá a nechá se 20 min stát.

Porovnávací roztok. 0,50 g zkoušené látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. Zahřívá se 8 min až 10 min na vodní lázni při 75 °C a pak se ochladí. Ke 2 μl roztoku se přidá 225 μl směsi objemových dílů *dimethylsulfoxidu R, N-(trimethylsilyl)imidazolu R* a *pyridinu bezvodého R* (19,5 + 22 + 58,5), opatrně se promíchá a nechá se 20 min stát.

Chromatografický postup se provádí obvykle za použití:
- skleněné kolony délky 0,9 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *poly(kyanopropyl)(methylfenylmethyl)siloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 215 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 275 °C.

Nastříknou se 2 μl porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní retenční čas pro silylderivát α-laktosy je asi 0,7 a pro silylderivát β-laktosy je asi 1,0 a jestliže rozlišení mezi píky je nejméně 3,0.

Nastříknou se 2 μl zkoušeného roztoku.

Obsah α-laktosy v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100S_a}{S_a + S_b},$$

obsah β-laktosy v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100S_b}{S_a + S_b},$$

v nichž značí:
S_a - plochu píku odpovídajícího silylderivátu α-laktosy,
S_b - plochu píku odpovídajícího silylderivátu β-laktosy.

Ztráta sušením *(2.2.32). Tato zkouška týkající se farmaceuticko-technologických vlastností může být provedena v závislosti na zamýšleném použití. Zkouška není závazná.*

Nejvýše 0,5%; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 80 °C.

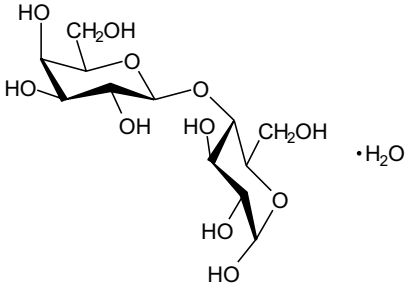
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Lactosum monohydricum

Monohydrát laktosy

Synonyma. Saccharum lactis, mléčný cukr



$C_{12}H_{22}O_{11} . H_2O$ M_r 360,31 CAS 5989-81-1

Je to monohydrát O-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-α-D-glukopyranosy. Mohou být upraveny jeho fyzikální vlastnosti a může obsahovat různé podíly amorfní laktosy.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno, ale pomalu rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *laktosy CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *laktosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *fruktosy CRL,* 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené body se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla musí být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *lihu 96% R* (5 + 95) a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

C. 0,25 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 5 ml *amoniaku 17,5% RS* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 80 °C; vzniká červené zbarvení.

D. Zkouška Voda, semimikrostanovení, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí zahřátím při 50 °C ve *vodě R,* zředí se jí na 10 ml a nechá se ochladit. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 6,0 g se povařením rozpustí v 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, ochladí se a přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +54,4° až +55,9°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený takto: 10,0 g se rozpustí zahřátím na 50 °C v 80 ml *vody R,* nechá se ochladit a smíchá se s 0,2 ml *amoniaku zředěného RS1*. 30 min se nechá stát a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 1,0 g se rozpustí ve vroucí *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml (roztok A). Absorbance roztoku měřená při 400 nm není vyšší než 0,04. 1,0 ml roztoku A se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Měří se absorbance roztoku při 210 nm až 300 nm. Při vlnových délkách 210 nm až 220 nm není absorbance vyšší než 0,25. Při vlnových délkách 270 nm až 300 nm není absorbance vyšší než 0,07.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 4,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 g Pb/ml)*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,5 % až 5,5 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky za použití směsi objemových dílů *formamidu R* a *methanolu R* (1 + 2) jako rozpouštědla.

Síranový popel. Nejvýše 0,1 %; k 1,00 g se přidá 1 ml *kyseliny sírové R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^2 aerobních mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce *(2.6.13)* na nepřítomnost *Escherichia coli.*

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Lactulosi solutio

Roztok laktulosy

Je to vodný roztok laktulosy (4-O-β-D-galaktopyranosyl-D-fruktosy), běžně připravované alkalickou izomerizací laktosy. Může obsahovat menší množství jiných cukrů, včetně laktosy, epilaktosy, galaktosy, tagatosy a fruktosy. Obsahuje nejméně 620 g/l laktulosy ($C_{12}H_{22}O_{11}$; M_r 342,30) a nejméně 95,0 % až 105,0 % deklarovaného obsahu laktulosy. Může obsahovat vhodnou protimikrobní přísadu.

Vlastnosti

Čirá viskózní bezbarvá nebo slabě hnědavě žlutá tekutina, mísitelná s vodou. Může se vyskytovat ve formě přesyceného roztoku nebo může obsahovat krystalky, které se zahřátím rozpustí.

10% roztok *(V/V)* je levotočivý.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,50 g se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok. 60 mg *laktulosy CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R,* roztoku *kyseliny borité R* (50 g/l), *methanolu R* a *ethylacetatu R* (10 + 15 + 20 + 55) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min při 100 °C až 105 °C, nechá se ochladit, postříká se roztokem *1,3-dihydroxynaftalenu R* (1,0 g/l) ve směsi obejmových dílů *kyseliny sírové R* a *methanolu R* (10 + 90) a vrstva se zahřívá 5 min při 110 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku je přibližně stejný s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K 0,1 g se přidá 10 ml *vody R* a 3 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

D. 0,25 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 5 ml *amoniaku 17,5% RS* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 80 °C; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 g se smíchá s *vodou prostou oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 7,0; měří se 10 ml roztoku S, k němuž bylo přidáno 0,1 ml nasyceného roztoku *chloridu draselného R.*

Relativní hustota (*2.2.5*). Nejvýše 1,38.

Příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku:
- plocha žádného píku odpovídajícího galaktose není větší než 15,0 % plochy píku odpovídajícího laktulose;
- plocha žádného píku odpovídajícího laktose není větší než 10,0 % plochy píku odpovídajícího laktulose;
- plocha žádného píku odpovídajícího epilaktose není větší než 10,0 % plochy píku odpovídajícího laktulose;
- plocha žádného píku odpovídajícího tagatose není větší než 4,0 % plochy píku odpovídajícího laktulose;
- plocha žádného píku odpovídajícího fruktose není větší než 1,0 % plochy píku odpovídajícího laktulose.

Siřičitany. 5,0 g se smíchá se 40 ml *vody R*, přidají se 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, 2,0 ml *fuchsinu RS1*, 2,0 ml roztoku *formaldehydu R* 0,5% *(V/V)* a 30 min se nechá stát.

Měří se absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při 583 nm proti kontrolnímu roztoku připravenému současně stejným způsobem za použití 10,0 ml *vody R* místo roztoku zkoušené látky. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10,0 ml základního *roztoku siřičitanů (1,5 g SO_2/ml*).

Bor. *Zkouška, je-li to možné, se neprovádí ve skleněném nádobí.*

Porovnávací roztok. 56,0 mg *kyseliny borité R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Uchovává se v dobře uzavřené polyethylenové nádobě.

Do čtyř polyethylenových 25ml baněk se převede:
- 1,00 g zkoušené látky a 1 ml *vody R* (roztok A),
- 1,00 g zkoušené látky a 1 ml porovnávacího roztoku (roztok B),
- 1 ml porovnávacího roztoku a 1 ml *vody R* (roztok C),
- 2 ml *vody R* (slepá zkouška).

Do každé baňky se přidají 4,0 ml *tlumivého roztoku octan-edetanového o pH 5,5*. Zamíchá se a přidají se 4,0 ml čerstvě připraveného *azomethinu H RS*. Zamíchá se a nechá se 1 h stát. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoků A, B a C při 420 nm proti roztoku D jako kontrolnímu roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže absorbance roztoku C je nejméně 0,25. Absorbance roztoku B není menší než dvojnásobek absorbance roztoku A (5 μg/g B).

Olovo *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce na olovo v cukrech (0,5 μg/g), počítáno na deklarovaný obsah laktulosy.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; počítáno na deklarovaný obsah laktulosy. Stanoví se s 1,50 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění *(2.6.12)*. Nejvýše 10^3 aerobních živých mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce *(2.6.13)* na přítomnost *Escherichia coli.*

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 4,00 g se smíchají s 20 ml *vody R* a přidá se 25,0 ml *acetonitrilu R* s mírným zahřátím a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok. 2,00 g *laktulosy CRL* a 0,2 g *laktosy R* se rozpustí ve 20 ml *vody R,* přidá se 25,0 ml *acetonitrilu R* s mírným zahřátím a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové kolony délky 0,05 m a vnitřního průměru 4,6 mm, následné ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm, obě naplněné *silikagelem aminopropylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm) a udržované při teplotě (38 ± 1) °C,
- mobilní fáze, která je směsí připravenou rozpuštěním 0,253 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* v 220 ml *vody R* a přidáním 780 ml *acetonitrilu R*. Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- refraktometrického detektoru udržovaného na (40 ± 1) °C.

Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční čas laktulosy asi 8,8 min a relativní retenční časy látek, vztaženo k laktulose: tagatosy asi 0,38, fruktosy asi 0,42, galaktosy asi 0,57, epilaktosy asi 0,90, laktosy asi 1,17.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaném chromatogramu je rozlišení mezi píky odpovídajícími laktulose a laktose nejméně 1,5. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi na 75 % až 82 % *(V/V),* aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se odděleně 20 µl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času laktulosy.

Vypočítá se obsah $C_{12}H_{22}O_{11}$ (laktulosy) v procentech z ploch píků a deklarovaného obsahu *laktulosy CRL.*

Označování

V označení na obalu se uvede:
- deklarovaný obsah laktulosy,
- název a koncentrace případně přidané protimikrobní přísady.

Uchovávání

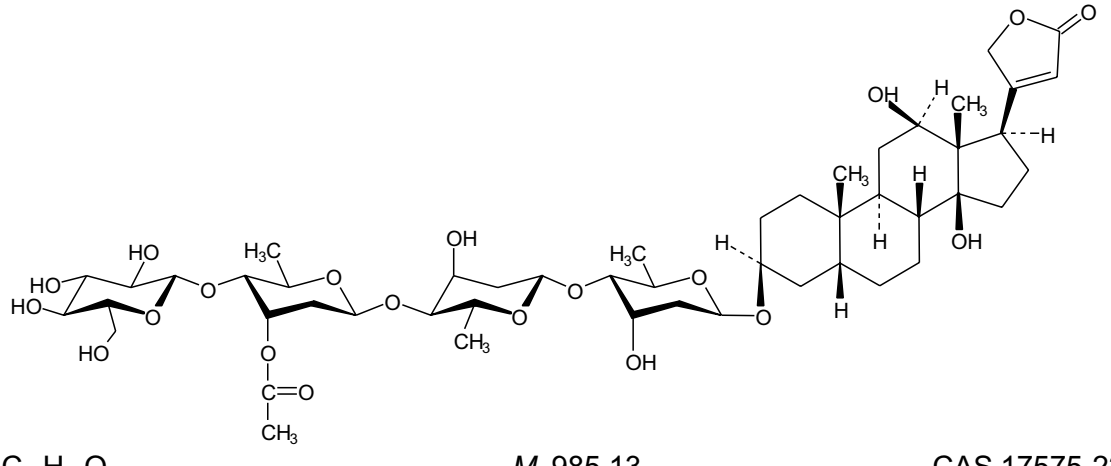
Při teplotě 10 °C až 20 °C.

Nečistoty

A. epilaktosa,
B. galaktosa,
C. laktosa,
D. fruktosa,
E. tagatosa.

†† Lanatosidum C

Lanatosid C



$C_{49}H_{76}O_{20}$ M_r 985,13 CAS 17575-22-3

Je to 3β-[(O-β-D-glukopyranosyl-(1→4)-O-(O-3-acetyl-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl--(1→4)-O-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl-(1→4)-2,6-dideoxy-β-D-*ribo*-hexapyranosyl) oxy]--12β,14-dihydroxy-5β,14β-kard-20(22)-enolid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{49}H_{76}O_{20}$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický nebo jemně krystalický hygroskopický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru, dobře rozpustný v methanolu. Při nízké vzdušné relativní vlhkosti ztrácí vodu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *lanatosidu C CRL*. Při porovnávání spektra je třeba věnovat zvláštní pozornost přítomnosti zřetelného absorpčního maxima při asi 1260 cm^{-1} a intenzitě absorpčního maxima při asi 1740 cm^{-1}. Tableta zkoušené látky a tableta referenční látky se připraví z následující směsi: 1 mg zkoušené látky a 1 mg referenční látky se odděleně rozpustí v 0,3 ml *methanolu R* a homogenizuje se s 0,4 g jemně upráškovaného a vysušeného *bromidu draselného R* tak dlouho, až je směs homogenní a dokonale suchá.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 0,5 mg se suspenduje v 0,2 ml lihu 60% *(V/V)*. Přidá se 0,1 ml *kyseliny dinitrobenzoové RS* a 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vzniká fialové zbarvení.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 0,05 ml *chloridu železitého RS1*, opatrně se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* tak, aby nedošlo k promíchání obou vrstev, a nechá se stát. Na styku obou tekutin vzniká hnědý prstenec, ne však načervenalý; stáním se horní vrstva barví zelenožlutě, potom modrozeleně a toto zbarvení prolíná do horní vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ nebo $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +32,0° až +35,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). Nanáší se roztok S.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *lanatosidu C CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 2 ml porovnávacího roztoku (c) se smíchají se 2 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se odděleně nanese do 10mm proužků po 5 μl každého roztoku a ihned se vyvíjí směsí objemových dílů *vody R*, *dichlormethanu R*, *lihu 96% R* a *toluenu R* (1 + 20 + 30 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min v proudu chladného vzduchu, postříká se směsí objemových dílů *kyseliny sírové R* a *lihu 96% R* (5 + 95), 15 min se zahřívá při 140 °C a pozoruje se v denním světle.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %); nejvýše tři takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %) a jedna z nich může být intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 7,5 %; 0,500 g se suší ve vakuové sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným ve zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

Před provedením zkoušky se zkoušená látka a referenční látka nechají stát 24 hodin v exsikátoru, který obsahuje nasycený roztok thiokyanatanu draselného R.

50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Současně za stejných podmínek se připraví porovnávací roztok za použití 50,0 mg *lanatosidu C CRL*. K 5,0 ml každého roztoku se přidají 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS* a nechá se 40 min ve vodní lázni při (20 ± 1) °C za chránění před světlem. Měří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 484 nm proti současně připravenému kontrolnímu roztoku, kterým je směs 5,0 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS*.

Obsah $C_{49}H_{76}O_{20}$ se vypočítá ze zjištěných absorbancí a koncentrací roztoků (b), aniž by se bral v úvahu výsledek zkoušky Ztráta sušením.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zcela naplněných skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřesahující 10 °C.

Venenum.

Lauromacrogolum

Lauromakrogol

Synonymum. Macrogoli aetherum laurilicum

Je to směs etherů směsných makrogolů s lineárními mastnými alkoholy, hlavně laurylalkoholem. Může obsahovat volné makrogoly a různá množství volného laurylalkoholu. Množství ethylenoxidu zreagovaného s laurylalkoholem je 3 až 23 oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota).

Vlastnosti

Lauromakrogol s 3 až 5 oxyethylenovými jednotkami v molekule je bezbarvá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná nebo dispergovatelná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru petrolejovém.

Lauromakrogol s 9 až 23 oxyethylenovými jednotkami v molekule je bílá voskovitá hmota, dobře rozpustná nebo dispergovatelná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru petrolejovém.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 40 mg *laurylalkoholu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Vrstva se impregnuje vyvíjením v chromatografické komoře obsahující dostatečné množství roztoku *kyseliny šťavelové R* (30 g/l) v *lihu 96% R.* Vrstva se nechá usušit na vzduchu, odděleně se nanese po 5 μl zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjí se dvakrát *ethylacetatem R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší po každém vyvíjení a postříká se zkoumadlem vanilin-kyselina sírová připraveným následujícím způsobem: 0,50 g *vanilinu R* se rozpustí v 50,0 ml *lihu 96% R* a zředí se *kyselinou sírovou R* na 100,0 ml. Pak se vrstva usuší na vzduchu, zahřívá se 10 min při asi 130 °C a nechá se vychladnout na vzduchu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik skvrn, z nichž jedna odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

E. 0,1 g se rozpustí nebo disperguje v 5 ml *lihu 96% R,* přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 10 ml *chloridu barnatého RS1* a 10 ml roztoku *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l); vznikne sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 5,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50 ml. Tento roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. 2,0 g se rozpustí v horké směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Počet oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota)	Číslo hydroxylové
3	165 až 180
4	145 až 165
5	130 až 140
9	90 až 100
10	85 až 95
12	73 až 83
15	64 až 74
20 až 23	40 až 60

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 2,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 3,0; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

1,4-Dioxan. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se postupem uvedeným ve stati Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g (m_T) zkoušené látky se odváží v lahvičce vhodného objemu, přidá se 1,0 ml *vody R,* a je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se odváží v lahvičce vhodného objemu, přidá se 0,20 g ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R.* Je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (b). K 0,1 g *ethylenoxidu RS* v lahvičce vhodné velikosti se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,01 g/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s butyl-kaučukovou membránou pokrytou hliníkem nebo teflonem a zajistí se hliníkovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Nástřik statického head-space postupu se obvykle provádí za použití:
- rovnovážné teploty: nejméně 70 °C,
- doby ohřevu: 45 min,
- teploty převodové kapiláry: 75 °C,
- nosného plynu: *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R*,
- doby tlakování: 30 s,
- objemu nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné nebo křemenné kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0 μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 2,0 a jestliže poměr signálu píku ethylenoxidu na stejném chromatogramu k šumu je nejméně 10.

Nastříkne se odděleně vhodný objem (např. 1 ml) plynné fáze zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Postup se opakuje ještě dvakrát. Na chromatogramu zkoušeného roztoku průměrná plocha píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina průměrné plochy píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 15 %.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T}{(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 15 %.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

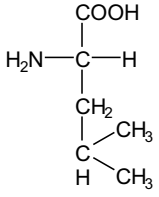
Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede počet oxyethylenových jednotek na molekulu laurylalkoholu (jmenovitá hodnota).

Leucinum

Leucin



$C_6H_{13}NO_2$ M_r 131,17 CAS 61-90-5

Je to kyselina (*S*)-2-amino-4-methylvalerová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{13}NO_2$.

Vlastnosti

Lesklé vločky nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml; roztok je levotočivý.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *leucinu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +14,5° až +16,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *leucinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *leucinu CRL* a 10 mg *valinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku, vysuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestávající ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg jemně upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívají se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým

vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědavě žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,12 mg $C_6H_{13}NO_2$.

Uchovávání

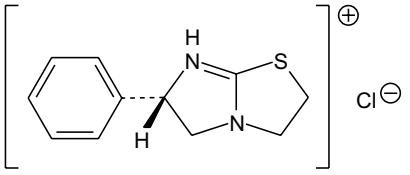
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

† Levamisoli hydrochloridum

Levamisoliumchlorid

Synonymum. Levamisolium chloratum



$C_{11}H_{13}ClN_2S$ M_r 240,75 CAS 16595-80-5

Je to (*S*)-2,3,5,6-tetrahydro-6-fenylimidazo(2,1-*b*)thiazoliumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{13}ClN_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, D a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,5 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 6 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 20 ml *dichlormethanu R* a protřepe se. Spodní vrstva se oddělí, promyje dvakrát 10 ml *vody R* a vysuší

síranem sodným bezvodým R. Potom se zfiltruje a odpaří ve vakuu při teplotě nepřevyšující 40 °C. Odparek taje *(2.2.14)* při 58 °C až 61 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *levamisoliumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

E. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 4,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -121° až -128°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *levamisoliumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí *amoniaku 26% R*, *acetonu R* a *toluenu R* (1 + 40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C a potom se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Vrstva se vystaví na 15 min v uzavřené nádobě parám jodu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny těsně nad startem, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 30 ml *lihu 96% R*, přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Spotřeba se odečte mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,08 mg $C_{11}H_{13}ClN_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Levistici radix

1998

Libečkový kořen

Synonymum. Radix levistici

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek a kořen druhu *Levisticum officinale* KOCH. Droga v celku obsahuje nejméně 4,0 ml silice v kilogramu drogy, řezaná droga obsahuje nejméně 3,0 ml silice v kilogramu drogy, obojí počítáno na sušinu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Oddenek a dlouhé kořeny jsou často podélně rozpůlené. Oddenek krátký o průměru až 5 cm, světle šedohnědý až žlutohnědý, jednohlavý nebo vícehlavý; kořeny jsou málo větvené, zbarvené shodně s oddenkem, jsou až 1,5 cm silné a až 25 cm dlouhé; lom obvykle hladký; na lomu patrná velmi široká žlutobílá kůra a úzké světle žluté dřevo.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: buňky korku při plošném pohledu mnohohranné nebo okrouhlé s hnědým obsahem; mohutný parenchym z buněk tenkostěnných, okrouhlých, ale i z buněk se stěnami mírně ztlustlými; skupiny náhradních vláken s nezdřevnatělými stěnami a charakteristickou síťovitou strukturou; úlomky větších, síťovitě ztlustlých cév o průměru až 125 μm; úlomky siličných kanálků o průměru až 180 μm.

Při pozorování v roztoku *glycerolu R* 50% (*V/V*) jsou patrna jednoduchá okrouhlá až vejčitá škrobová zrna o průměru až asi 12 μm a četná větší složená zrna.

C. Chromatogram porovnávacího roztoku ze zkoušky Angelicae radix, viz Zkoušky na čistotu, se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a označí se skvrna eugenolu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrna fluoreskuje intenzivně bledě modře až zelenomodře, hodnota R_F je jen o málo nižší než hodnota R_F eugenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Těsně pod hlavní skvrnou na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou jedna nebo dvě menší bledě modré až zelenomodré skvrny, v dolní části chromatogramu jsou patrné další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Angelicae radix. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenční přísadou pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 2 g čerstvě práškované drogy (500) se protřepávají 10 min s 10 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R;* zfiltruje se a filtrát se zředí výše uvedenou směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *eugenolu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se touto směsí na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *dichlormethanu R* a *toluenu R* (1 + 1) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a vyvíjí se za stejných podmínek ještě jednou. Vysuší se na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v dolní třetině žádná intenzivní modrá nebo modrofialová skvrna.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 %; stanoví se s 50 g zkoušené drogy.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 8,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Voda, destilací (*2.2.13*). Nejvýše 12,0 %; stanoví se s 25,00 g zkoušené drogy.

Stanovení obsahu

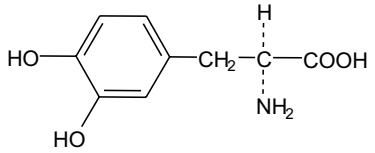
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách *(2.8.12)*. 40,0 g upráškované (500) drogy se těsně před stanovením destiluje 4 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v baňce na 2000 ml s 500 ml *vody R* a deseti kapkami *parafinu tekutého R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Levodopum

Levodopa



$C_9H_{11}NO_4$ M_r 197,19 CAS 59-92-7

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{11}NO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nahnědlý krystalický prášek. Je těžce rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v etheru, snadno rozpustná v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a mírně rozpustná v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS.*

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *levodopy CRL*.

B. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *chloridu železitého RS2;* vzniká zelené zbarvení, které se přidáním 0,1 g *methenaminu R* změní na modrofialové.

C. Asi 5 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 5 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS* obsahujícího *molybdenan amonný R* (100 g/l); vznikne žluté zbarvení, které se přidáním *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* změní na červené.

D. Asi 5 mg se smíchá s 1 ml *vody R,* 1 ml *pyridinu R* a asi 5 mg *nitrobenzoylchloridu R* a nechá se 3 min stát; vzniká fialové zbarvení, které se povařením směsi změní na světle žluté. Za stálého třepání se přidá 0,2 ml *uhličitanu sodného RS;* opět se objeví fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 7,0; měří se následující suspenze: 0,10 g se 15 min protřepává s 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -1,27° až -1,34; měří se následující roztok: množství odpovídající 0,200 g vysušené látky a 5 g *methenaminu R* se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml. Roztok se nechá 3 h stát chráněn před světlem.

Absorbance *(2.2.25)*. 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje maximum při 280 nm. Specifická absorbance v maximu je 137 až 147, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *tyrosinu R* se rozpustí v 1 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *methanolem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml zkoušeného roztoku.

Na vrstvu se odděleně nanese do proužků (asi 20 mm) 10 μl zkoušeného roztoku, 10 μl porovnávacího roztoku (a) a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, kyseliny octové ledové R* a *1-butanolu R* (25 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu, postříká se čerstvě připravenou směsí stejných objemových dílů roztoku *chloridu železitého R* (100 g/l) a *hexakyanoželezitanu draselného R* (50 g/l) a ihned se pozoruje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou vedlejší skvrny intenzivněji zbarveny než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže vedlejší zřetelná skvrna ležící nad hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,50 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,180 g se rozpustí, je-li potřeba zahřátím, v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 25 ml *kyseliny octové bezvodé R*, 25 ml *dioxanu R*, 0,1 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do zeleného zbarvení roztoku.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,72 mg $C_9H_{11}NO_4$.

Uchovávání

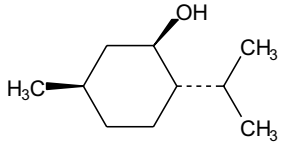
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Levomentholum

Levomenthol

Synonyma. Mentholum, menthol



$C_{10}H_{20}O$ M_r 156,27 CAS 2216-51-5

Je to (1*R*,3*R*,4*S*)-3-*p*-menthanol.

Vlastnosti

Hranolovité nebo jehlicovité bezbarvé lesklé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, v etheru a v etheru petrolejovém, snadno rozpustný v mastných olejích a v tekutém parafinu, velmi těžce rozpustný v glycerolu.

Taje při asi 43 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok. 25 mg *mentholu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Suší se na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel, postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky.

Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je retenčním časem a přibližnými rozměry shodný s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

D. 0,20 g se rozpustí v 0,5 ml *pyridinu bezvodého R*, přidají se 3 ml roztoku *dinitrobenzoylchloridu R* (150 g/l) v *pyridinu bezvodém R* a 10 min se zahřívá na vodní lázni. Po malých dávkách a za stálého míchání se přidá 7,0 ml *vody R* a směs se nechá 30 min ve vodě s ledem; vznikne sraženina. Supernatantní tekutina se slije, sraženina se promyje dvakrát 5 ml ledové *vody R*, rekrystalizuje se z 10 ml *acetonu R*, promyje se ledovým *acetonem R* a suší se 30 min při 75 °C při tlaku nepřesahujícím 2,7 kPa. Krystaly tají *(2.2.14)* při 154 °C až 157 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R*, zředí se jím na 10 ml a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -48° až -51°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 40,0 mg zkoušené látky a 40,0 mg *isomentholu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,10 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 40,0 mg *mentholu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2,0 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 15 % *makrogolu 1500 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota nástřikového prostoru na 150 °C a teplota detektoru na 200 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztoku a zaznamenají se chromatogramy po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času píku mentholu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) součet ploch píků, kromě hlavního píku, není větší než 1 % plochy hlavního píku. Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05 % plochy hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) není rozlišení mezi píky mentholu a isomentholu menší než 1,4 a poměr signálu hlavního píku k šumu je nejméně 5.

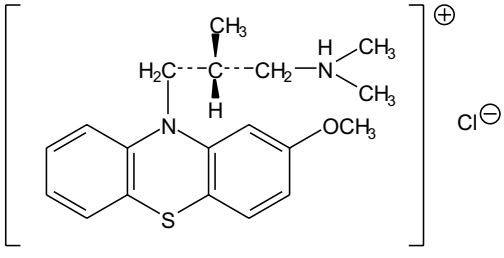
Zbytek po odpaření. 2,00 g se odpaří na vodní lázni a zahřívají se 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1,0 mg (0,05 %).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, v chladu.

† Levomepromazini hydrochloridum

Levomepromaziniumchlorid



$C_{19}H_{25}ClN_2OS$ M_r 364,93 CAS 1236-99-3

Je to (*R*)-[2-methyl-3-(2-methoxy-10-fenothiazinyl)propyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{25}ClN_2OS$.

Vlastnosti

Bílý nebo velmi slabě nažloutlý krystalický prášek, slabě hygroskopický, na světle a vzduchu je nestálý. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Vyskytuje ve dvou formách; jedna taje při asi 142 °C, druhá při asi 162 °C.

Zkoušky totožnosti

A. *Roztok se připraví za ochrany před přímým světlem a absorbance se změří ihned po přípravě.* 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 340 nm; roztok vykazuje maxima při 250 nm a 302 nm. Specifická absorbance v maximu při 250 nm je 640 až 700.

B. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.3)*.

C. K 0,2 g se v dělicí nálevce na 100 ml přidá 5 ml *vody R*, 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a silně se vytřepe dvakrát 10 ml *etheru R*. Spojené etherové výtřepky se zfiltrují přes *síran sodný bezvodý R* a odpaří do sucha. Odparek se suší 15 min při 100 °C až 105 °C a provede se krystalizace ve vodě s ledem. Jestliže je třeba, iniciuje se krystalizace třením skleněné tyčinky o stěnu nádoby. Vzniklé krystaly se suší 2 h při 60 °C; krystaly tají *(2.2.14)* při 122 °C až 128 °C.

D. Vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* nebo 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +9,5° až +11,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R, diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 50 ml *2-propanolu R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,49 mg sloučeniny $C_{19}H_{25}ClN_2OS$.

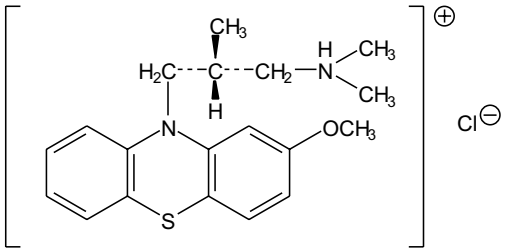
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Levomepromazini hydrogenomaleas

Levomepromaziniumhydrogenmaleinat

Synonyma. Levomepromazini maleas, Levomepromazinium hydrogenmaleinicum



$C_{23}H_{28}N_2O_5S$ M_r 444,54 CAS 7104-38-3

Je to (*R*)-[2-methyl-3-(2-methoxy-10-fenothiazinyl)propyl]dimethylamoniumhydrogenmaleinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{28}N_2O_5S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalicky prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Na světle a vzduchu je nestálý.

Taje při asi 186 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *levomepromaziniumhydrogenmaleinatu CRL*.

C. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.3)*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *kyseliny maleinové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do proužků (10 mm x 2 mm) po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *diisopropyletheru R* (3 + 7 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se suší 10 min při 120 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě skvrny ve tvaru proužku na startu, je přítomna další skvrna ve tvaru proužku odpovídající polohou a velikostí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 5,5. *Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem*. 0,50 g se v kuželové baňce protřepe s 25,0 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a nechá se usadit. Měří se supernatantní tekutina.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -7,0° až -8,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g v *dimethylformamidu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za ochrany před světlem a roztoky se připraví těsně před použitím.* Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (10 + 90) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R, diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,46 mg sloučeniny $C_{23}H_{28}N_2O_5S$.

Uchovávání

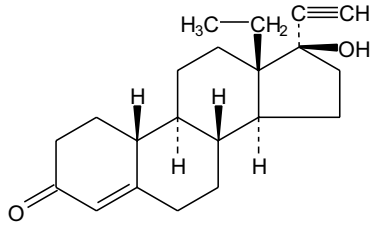
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 2-methoxyfenothiazin,
B. levomepromazin 5-oxid.

† Levonorgestrelum

Levonorgestrel



$C_{21}H_{28}O_2$ M_r 312,45 CAS 797-63-7

Je to 13β-ethyl-17β-hydroxy-18,19-dinor-17α-pregn-4-en-20-in-3-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{28}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *levonorgestrelu CRL*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -30° až -35°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,200 g v *chloroformu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 4 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *levonorgestrelu CRL* a 5 mg *ethinylestradiolu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *dichlormethanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu, potom se postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l) v *lihu 96% R,* zahřívá se při 100 °C až 105 °C a ihned se pozoruje v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 45 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 10 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a po 1 min se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,25 mg $C_{21}H_{28}O_2$.

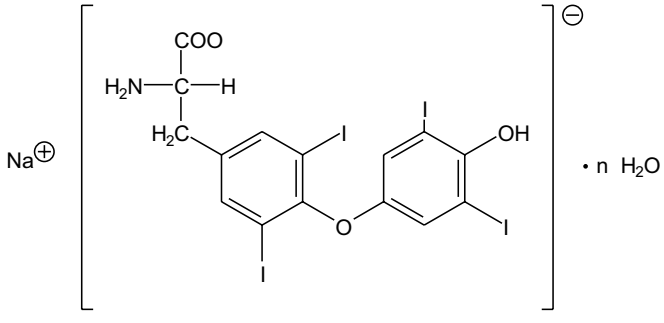
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Levothyroxinum natricum

Sodná sůl levothyroxinu



$C_{15}H_{10}I_4NNaO_4 \cdot nH_2O$ CAS 25416-65-3

M_r bezvodé 798,86 CAS 55-03-8

Je to hydratovaná sodná sůl kyseliny (*S*)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-dijodfenoxy)-3,5-dijodfenyl]propionové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$. Obsahuje proměnlivé množství krystalické vody.

Vlastnosti

Téměř bílý nebo slabě hnědožlutý prášek nebo jemný krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli levothyroxinu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (5 + 70) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *sodné soli levothyroxinu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (5 + 70) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *sodné soli liothyroninu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (5 + 70) a zředí se stejnou směsí na 5 ml. 1 ml tohoto roztoku se smíchá s 1 ml zkoušeného roztoku.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *2-propanolu R* a *ethylacetatu R* (20 + 35 + 55) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS*, zahřívá se při 100 °C až 105 °C do objevení skvrn a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K asi 50 mg se v porcelánové misce přidá několik kapek *kyseliny sírové R* a zahřeje se; vyvíjejí se fialové páry.

E. K 20 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, zahřívá se na vodní lázni, potom opatrně nad plamenem a postupně se zvyšuje teplota až na asi 600 °C. Pokračuje se v žíhání až do vymizení většiny černých částic. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *vody R;* tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí mírným varem ve 23 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *lihu 96% R* (1 + 4). Ochladí se a zředí se stejnou směsí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Čerstvě připravený roztok S není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_3$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +16° až +20°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Liothyronin a jiné příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy získané při Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha píku odpovídajícího liothyroninu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího liothyroninu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 6,0 % až 12 %; 0,100 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se chrání před světlem.*

Zkoušený roztok (a). 20,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném v methanolu RS* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným v methanolu RS* na 200,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *levothyroxinu CRL* se rozpustí v *hydroxidu sodném v methanolu RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 200,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 5 mg *sodné soli liothyroninu CRL* se rozpustí v *hydroxidu sodném v methanolu RS* a zředí se jím na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (c). Smíchají se stejné objemové díly porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b).

Porovnávací roztok (d). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným v methanolu RS* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem nitrilovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (1 + 300 + 700), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 50 μl každého roztoku. Zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající 3,5násobku retenčního času hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími levothyroxinu a liothyroninu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je nejméně 4 a poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) k šumu je nejméně 5. Vypočítá se obsah $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ v procentech podle vzorce:

$$\frac{S_u}{0{,}972 \cdot S_r} \cdot C_r ,$$

v němž značí:
S_u - plochu píku levothyroxinu na chromatogramu zkoušeného roztoku (b),
S_r - plochu píku levothyroxinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
C_r - deklarovaný obsah $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ *levothyroxinu CRL* v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

Lichen islandicus

Lišejník islandský

N

Je to celá nebo řezaná usušená stélka druhu *Cetraria islandica* (L.) ACHARIUS *sensu lato*.

Vlastnosti

Droga slabého charakteristického pachu a nahořklé, mírně slizovité chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Stélka až 15 cm dlouhá, nepravidelně vidličnatě větvená, je tvořena hladkými, žlábkovitými nebo téměř plochými, tuhými, křehkými proužky, 0,3 cm až 1,5 cm širokými asi 0,5 mm silnými, občas zubatými na okrajích s pyknidiemi. Svrchní strana stélky je nazelenalá až zelenohnědá, spodní strana šedobílá až světle hnědá s bělavými, vpadlými skvrnami (tzv. dýchací otvory). Velmi zřídka jsou patrná hnědá, miskovitá apothecia.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné úlomky pseudoparenchymu tvořeného v okrajové vrstvě ztlustlými hyfami s úzkým luminem; přilehlá vrstva je tvořena hyfami se širokým luminem a nazelenalými až nahnědlými buňkami; úlomky dřeňové vrstvy tvořené volně propletenými hyfami, které obklopují nazelenalé až nahnědlé buňky; občas i úlomky okraje stélky s trubkovitými nebo válcovitými spermogoniemi až 160 μm širokými a až 400 μm dlouhými.

C. 1,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *vody R* a vaří se 2 min až 3 min. Šedohnědý roztok po ochlazení přechází v gel.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 5 ml *acetonu R* a zahřívá se 2 min až 3 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 5 mg *anetholu R* a 5 mg *kyseliny kávové R* se rozpustí ve 2 ml *acetonu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R, methanolu R*, *kyseliny octové ledové R* a *toluenu R* (5 + 5 + 10 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině šedomodrá až modrofialová skvrna (kyselina kávová), v horní polovině modrá až modrofialová skvrna (anethol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá hlavní, fialová až šedá skvrna (kyselina fumarprotocetrarová) polohou skvrně kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, slabě zbarvené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 5 %.

Jiné druhy lišejníků. Na chromatogramu zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti D není přítomná červenofialová skvrna s hodnotou R_F nižší než hodnota R_F anetholu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 3,0 %.

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 4,5. Stanoví se z práškované drogy (355).

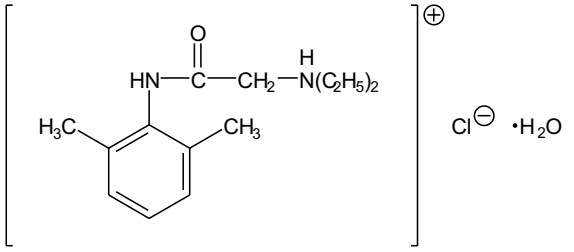
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

† Lidocaini hydrochloridum

Lidokainiumchlorid



$C_{14}H_{23}ClN_2O \cdot H_2O$ M_r 288,82 CAS 6108-05-0

M_r bezvodého 270,80

Je to monohydrát (2,6-dimethylbenzamidomethyl)diethylamoniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{23}ClN_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 74 °C až 79 °C, stanoví se bez předchozího vysušení.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *lidokainiumchloridu CRL*.

C. 0,2 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 10 ml *trinitrofenolu RS*. Vzniklá sraženina se promyje *vodou R* a usuší se. Sraženina taje *(2.2.14)* při asi 230 °C.

D. K asi 5 mg se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R,* odpaří se do sucha na vodní lázni, zbytek se ochladí a rozpustí v 5 ml *acetonu R*. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu draselného v lihu R;* vznikne zelené zbarvení.

E. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 5 ml *vody R*, zalkalizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* a vzniklá sraženina se na filtru promyje *vodou R*. Polovina sraženiny se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,5 ml roztoku *dusičnanu kobaltnatého R* (100 g/l); vznikne modrozelená sraženina.

F. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 5,5; měří se 1,0 ml roztoku S zředěného *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

2,6-Dimethylanilin.

Roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Tento roztok se použije k přípravě zkoušeného roztoku.

Roztok (b). 50 mg *2,6-dimethylanilinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. Tento roztok se použije k přípravě porovnávacího roztoku.

Použijí se tři zkumavky s plochým dnem. Do první se odměří 2 ml roztoku (a), do druhé 1 ml roztoku (b) a 1 ml *methanolu R* a do třetí 2 ml *methanolu R* (slepá zkouška). Do každé zkumavky se přidá po 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (10 g/l) v *methanolu R* a 2 ml *kyseliny octové ledové R* a nechá se stát 10 min při pokojové teplotě. Intenzita žlutého zbarvení zkoušeného roztoku odpovídá intenzitě zbarvení mezi zbarvením slepé zkoušky a porovnávacího roztoku (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 25 ml a provede se předfiltrace. 10 ml předfiltrátu vyhovuje limitní zkoušce E na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 5,5 % až 7,0 %; stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 6 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,08 mg sloučeniny $C_{14}H_{23}ClN_2O$.

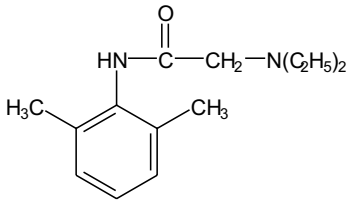
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Lidocainum

Lidokain



$C_{14}H_{22}N_2O$ M_r 234,34 CAS 137-58-6

Je to 2-diethylamino-2′,6′-dimethylacetanilid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{22}N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, snadno rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 66 °C až 70 °C, stanoví se bez předchozího vysušení.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *lidokainu CRL*.

C. 0,20 g se rozpustí zahřátím ve směsi 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 10 ml *vody R* a přidá se 10 ml *trinitrofenolu RS*. Vzniklá sraženina se promyje *vodou R* a usuší se. Sraženina taje *(2.2.14)* při asi 230 °C, za rozkladu.

D. K asi 5 mg se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R*, odpaří se do sucha na vodní lázni, zbytek se ochladí a rozpustí v 5 ml *acetonu R*. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu draselného v lihu RS;* vznikne zelené zbarvení.

E. Asi 0,1 g se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,5 ml roztoku *dusičnanu kobaltnatého R* (100 g/l); vznikne modrozelená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

2,6-Dimethylanilin. 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Ke 2 ml se přidá 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (10 g/l) v *methanolu R* a 2 ml *kyseliny octové ledové R* a nechá se 10 min stát. Žluté zbarvení tohoto roztoku není intenzivnější než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 2 ml roztoku *2,6-dimethylanilinu R* (2,5 mg/l) v *methanolu R* (100 μg/g).

Chloridy *(2.4.4)*. 1,4 g se rozpustí ve směsi 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 12 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (35 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,2 g se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 20 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,200 g se přidá 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a míchá se do úplného rozpuštění. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,43 mg $C_{14}H_{22}N_2O$.

Uchovávání

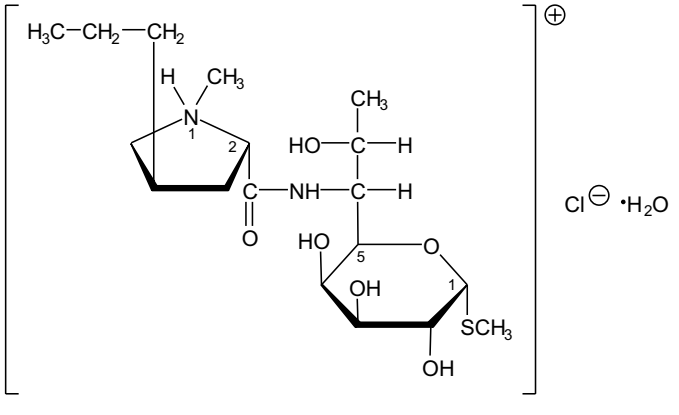
V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

† Lincomycini hydrochloridum monohydricum

Linkomyciniumchlorid

Synonyma. Lincomycini hydrochloridum, Lincomycinium chloratum



$C_{18}H_{35}ClN_2O_6S \cdot H_2O$ M_r 461,01 CAS 7179-49-9

M_r bezvodého 443,00

Je to monohydrát (2*S*)-*trans*-1-methyl-2-(6,8-dideoxy-1-methylthio-α-D-*erythro*-D-*galakto*-oktopyranosyl)karboxamido-4-propylpyrrolidiniumchlorid, antibiotikum produkované

mikroorganismem *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* nebo připravené jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 82,5 % až 93,0 % linkomycinu ($C_{18}H_{34}N_2O_6S$; M_r 406,54).

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *linkomyciniumchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *linkomyciniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *linkomyciniumchloridu CRL* a 10 mg *klindamyciniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *2-propanolu R,* roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo *amoniakem 17,5% RS* upraveno na hodnotu 9,6, a *ethylacetatu R* (20 + 40 + 45) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (1 g/l). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 3 min se zahřívá ve vodní lázni. Přidají se 3 ml *uhličitanu sodného RS* a 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (20 g/l); vzniká fialově červené zbarvení.

D. 0,1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2. Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 5,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +135° až +150°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,000 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Linkomycin B. Hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku (a) získaný ve Stanovení obsahu. Plocha píku linkomycinu B, který se eluuje těsně před linkomycinem, není větší než 5 % plochy píku linkomycinu.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,0 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,1 % až 4,6 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstaňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,50 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *dotriakontanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,200 g *dotriakontanu R* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Zkoušený roztok (a). 0,100 g se rozpustí v roztoku *imidazolu R* (20 g/l) v *chloroformu R*, zředí se stejným roztokem na 100,0 ml a protřepává se do úplného rozpuštění. 4,0 ml tohoto roztoku se vpraví do 15ml centrifugační zkumavky se zabroušenou zátkou, přidá se 1,0 ml směsi objemových dílů *chlortrimethylsilanu R* a *N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu R* (1 + 99) a opatrně se promíchá. Na zkumavku se lehce nasadí zátka a 30 min se zahřívá při 65 °C.

Zkoušený roztok (b). Připraví se stejně, jak je popsáno u zkoušeného roztoku (a), ale před rozpuštěním zkoušené látky se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Porovnávcí roztok. Připraví se stejně, jak je popsáno u zkoušeného roztoku (a), ale místo zkoušené látky se použije 0,100 g *linkomyciniumchloridu CRL* a před rozpuštěním referenční látky se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti asi 45 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 260 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je 260 °C až 290 °C. Nastřikují se zvolené objemy zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

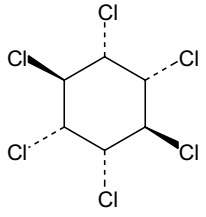
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakterálních endotoxinů.

† Lindanum

Lindan



$C_6H_6Cl_6$ M_r 290,83 CAS 58-89-9

Je to 1α,2α,3ß,4α,5α,6ß-hexachlorcyklohexan. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_6H_6Cl_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v etheru, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 112 °C až 115 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *lindanu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se rozpustí ve 4 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l RS* a nechá se 10 min stát; roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml; roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *lindanu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *α-hexachlorcyklohexanu CRL* se rozpustí ve *zkoušeném roztoku (a)* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (10 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu, 15 min se ozařuje ultrafialovým světlem při 254 nm, postříká se roztokem *dikarboxidiniumchloridu R (6 g/l)* v *lihu R* 90% *(V/V)* a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. K 0,75 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 15 ml *vody R*, 1 min se vaří, nechá se ochladit za častého protřepání a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidají 3 ml *vody R* a 2 ml *lihu 96% R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,200 g se přidá 10 ml *lihu 96% R* a zahřívá se na vodní lázni do rozpuštění. Ochladí se, přidá se 20 ml roztoku *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a nechá se 10 min stát za častého promíchání. Přidá se 50 ml *vody R*, 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 5 ml *síranu amonno-železitého RS2* a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku červenožlutého zabarvení. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,694 mg $C_6H_6Cl_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Lini oleum

N

Lněný olej

CAS 8001-26-1

Je to olej získaný lisováním nebo extrakcí zralých semen druhu *Linum usitatissimum* L.

Vlastnosti

Žlutá až hnědožlutá čirá průhledná kapalina, na vzduchu houstne a barví se temněji. Je velmi těžce rozpustný v lihu 96 %, snadno rozpustný v etheru, mísitelný s petrolejovým etherem.

Tuhne při teplotě asi -20 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se zkouška Totožnost olejů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.2)*. Chromatogram zkoušeného roztoku se shoduje s charakteristickým chromatogramem pro lněný olej.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,926 až 0,936 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,478 až 1,482.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 4,5; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 160,0 až 200,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 188,0 až 196,0; stanoví se se 2,0 g zkoušené látky.

Pryskyřičné oleje, tekutý parafin. 5 g se smíchá s 10 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (150 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) a zahřívá se na vodní lázni pod zpětným chladičem do úplného zmýdelnění. Pak se roztok zředí 50 ml *vody R;* vzhled roztoku se nezmění.

Nevysychavé oleje. 0,5 ml zkoušené látky se převede na Petriho misku o průměru 8 cm a nechá se stát volně na vzduchu 24 h; vznikne pevný průsvitný povlak.

Bělené nebo zkažené oleje. 1 ml se ve zkumavce protřepává 1 min s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, pak se smíchá s 1 ml *resorcinolu RS* a protřepává se 5 s. Po 5 min stání není vodná vrstva zbarvena intenzivněji *(2.2.2)* než 1 ml směsi složené z 0,5 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l RS* a 9,5 ml vody R.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Lini semen

Lněné semeno

Synonymum. Semen lini

Je to usušené zralé semeno druhu *Linum usitatissimum* L.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Semena plochá, podlouhle vejčitá, 4 mm až 6 mm dlouhá, 2 mm až 3 mm široká, 1,5 mm až 2 mm tlustá. Na jednom konci zaokrouhlená, na druhém vybíhající v kosý hrot a blízko něho je jako nevýrazná prohloubenina patrný pupek. Osemení je tmavě červenohnědé, hladké, lesklé, pod lupou je patrný jemně jamkovitý povrch. Uvnitř semene je tenký, bělavý endosperm a zárodek, který je tvořen dvěma velkými, plochými, nažloutlými, olejovými dělohami. Zárodečný kořínek je orientován proti pupku.

B. Pozoruje se pod mikroskopem. Pokožka osemení je tvořena izodiametrickými buňkami: vnější stěny buněk obsahují sliz, vnitřní stěny jsou zkorkovatělé pod ní vrstva kolenchymatických buněk a jednořadá vrstva protáhlých sklereid 120 μm až 190 μm dlouhých a 12 μm až 15 μm širokých, se ztlustlými, tečkovanými stěnami; hyalinní vrstva z tenkostěnného parenchymu;

vnitřní pokožka jednovrstevná z plochých, mnohohranných buněk, které obsahují oranžově hnědé barvivo. Endosperm a dělohy z mnohohranných, parenchymatických buněk se slabě ztlustlými stěnami; obsahující aleuronová zrna o průměru až 20 μm a kapky mastného oleje; škrob chybí.

Práškovaná droga. Mastný, žlutohnědý prášek, nevýrazného, charakteristického pachu a slizovité, olejovité chuti. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky vnějších pokožkových buněk osemení obsahující sliz; podpokožková kolenchymatická vrstva při plošném pohledu s okrouhlými buňkami a trojúhelníkovitými intercelulárami, často se skupinami podlouhlých sklereid s tečkovanými stěnami; tenkostěnné buňky hyalinní vrstvy s tečkovanými stěnami jsou často provázeny podlouhlými sklereidami, které s nimi svírají pravý úhel. Pigmentové buňky vnitřní pokožky osemení; parenchym endospermu a děloh obsahuje aleuronová zrna a mastný olej. Škrobová zrna chybí.

Zkoušky na čistotu

Pach a chuť. Droga nechutná ani nepáchne žlukle.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1,5 %.

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 4 (nerozdrobněná droga). Nejméně 4,5 (práškovaná droga (710)).

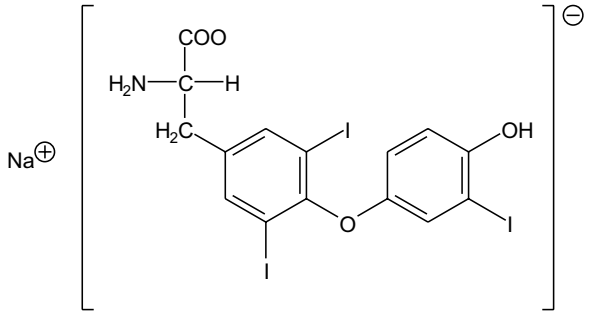
Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 6,0 %; stanoví se s 1,00 g práškované drogy.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněno před světlem.

† Liothyroninum natricum

Sodná sůl liothyroninu



$C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$ M_r 672,96 CAS 55-06-1

Je to sodná sůl kyseliny (*S*)-2-amino-3-[4-hydroxy-3-jodfenoxy)-3,5-dijodfenyl]propionové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě zbarvený prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 10,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 319 nm a specifická absorbance v tomto maximu je 63 až 69, počítáno na vysušenou látku.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli liothyroninu CRL*.

D. K asi 50 mg se v porcelánové misce přidá několik kapek *kyseliny sírové R* a zahřeje se; vyvíjejí se fialové páry.

E. Zbytek získaný ve zkoušce Síranový popel se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,250 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *lihu 96% R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Čerstvě připravený roztok S není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok intenzity 5 nejpodobnějšího zbarvení *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +18,0° až +22,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Levothyroxin a jiné příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy získané při Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha píku odpovídajícího levothyroxinu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5,0 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího levothyroxinu, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Chloridy. Nejvýše 2,0 %, vyjádřeno jako NaCl a počítáno na vysušenou látku. 0,500 g se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (2,0 g/l) a zředí se jím na 100 ml. Přidá se 15 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,05 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,05 mol/l VS* odpovídá 2,93 mg NaCl.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 4,0 %; 0,500 g se suší 2 h v sušárně při 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. 9,0 % až 12,2 %, počítáno na vysušenou látku; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). 20,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném v methanolu RS* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným v methanolu RS* na 200 ml.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *sodné soli liothyroninu CRL* se rozpustí v *hydroxidu sodném v methanolu RS* a zředí se jím na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným v methanolu RS* na 200 ml.

Porovnávací roztok (c). 5 mg *sodné soli levothyroxinu CRL* se rozpustí v *hydroxidu sodném v methanolu RS* a zředí se jím na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (d). Smíchají se stejné objemové díly porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c).

Porovnávací roztok (e). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *hydroxidem sodným v methanolu RS* na 25,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem nitrilovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny fosforečné R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (5 + 300 + 700), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 225 μm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 50 μl každého roztoku. Zaznamenává se chromatogram zkoušeného roztoku (a) po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím liothyroninu a píkem odpovídajícím levothyroxinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je nejméně 4 a poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) k šumu je nejméně 5. Obsah $C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$ se vypočítá z plochy píků na chromatogramech zkoušeného roztoku (b), porovnávacího roztoku (b) a deklarovaného obsahu $C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$ v *sodné soli liothyroninu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

Liquiritiae radix

1998

Lékořicový kořen

Synonymum. Radix liquiritiae

Je to usušený neloupaný nebo loupaný, celý nebo řezaný kořen a výběžky druhu *Glycyrrhiza glabra* L.

Obsahuje nejméně 4,0 % kyseliny glycyrrhizinové ($C_{42}H_{62}O_{16}$; M_r 823), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kořen málo větvený; kůra nahnědle šedá až hnědá, s podélnými rýhami a se zbytky postranních kořenů. Válcovité výběžky o průměru 1 cm až 2 cm, svrchní strana podobná kořeni, ale příležitostně s malými pupeny. Lom kořene a výběžků je zrnitý a vláknitý. Vrstva korku úzká, vrstva sekundárního lýka silná, světle žlutá, s paprsčitou strukturou. Žlutě zbarvené dřevo je kompaktní, s paprsčitou strukturou. Výběžek má uprostřed dřeň, která u kořene chybí. U loupaného kořene chybí zevní část kůry.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle žlutý až mírně našedlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky žlutých silnostěnných vláken 700 μm až 1200 μm dlouhých, o průměru 10 μm až 20 μm s tečkovaným luminem, často provázených komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého, které jsou 10 μm až 35 μm dlouhé a 2 μm až 5 μm široké. Stěny velkých cév jsou žluté, 5 μm až 10 μm silné, zdřevnatělé s četnými dvůrkovitými ztenčeninami a štěrbinovitými otvory; úlomky korku s tenkostěnnými buňkami a jednotlivými krystaly šťavelanu vápenatého; krystaly šťavelanu vápenatého se nacházejí i v úlomcích parenchymu. U loupaného kořene úlomky korku chybějí.

Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu 85% R* a *vody R;* v droze jsou patrná okrouhlá nebo oválná škrobová zrna o průměru 2 μm až 20 μm.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,50 g práškované drogy (180) se v 50ml baňce s kulatým dnem smíchá se 16,0 ml *vody R* a 4,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem a po ochlazení se zfiltruje. Filtr a baňka se suší 60 min při 105 °C. Filtr se vloží zpět do baňky, přidá se 20,0 ml *etheru R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 40 °C pod zpětným chladičem, po ochlazení se zfitruje a filtrát se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 5,0 ml *etheru R.*

Porovnávací roztok. 5,0 mg *kyseliny glycyrrhetinové R* a 5,0 mg *thymolu R* se rozpustí v 5,0 ml *etheru R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R*, *lihu 96% R* a *ethylacetatu R* (1 + 9 + 25 + 65) po dráze 15 cm.

Vrstva se suší 5 min na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramech zkoušeného a porovnávacího roztoku je v dolní polovině patrná skvrna kyseliny glycyrrhetinové. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je patrna v dolní polovině fialová skvrna (kyselina glycyrrhetinová) a v horní třetině červená skvrna (thymol). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně kyseliny glycyrrhetinové na chromatogramu porovnávacího roztoku a žlutě zbarvená skvrna (isoliquiridigenin) odpovídající polohou skvrně thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku; na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 10,0 % (neloupaná droga). Nejvýše 6,0 % (loupaná droga).

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové *(2.8.1)*. Nejvýše 2,0 % (neloupaná droga). Nejvýše 0,5 % (loupaná droga).

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 1,000 g práškované drogy (180) se ve 150ml kuželové baňce smíchá se 100,0 ml roztoku *amoniaku 17,5% RS* (8 g/l) a vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně. Část supernatantu se odstřeďuje a 1,0 ml se zředí roztokem *amoniaku 17,5% RS* (8 g/l) na 5,0 ml. Roztok se zfiltruje (0,45 μm) a filtrát se použije jako zkoušený roztok.
Základní roztok. 0,130 g *kyseliny glycyrrhizinové amonné soli CRL* se rozpustí v roztoku *amoniaku 17,5% RS* (8 g/l) a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *amoniaku 17,5% RS* (8 g/l) na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *amoniaku 17,5% RS* (8 g/l) na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 15,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *amoniaku 17,5% RS* (8 g/l) na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny octové R*, *acetonitrilu R* a *vody R* (6 + 30 + 64), při průtokové rychlosti 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 10 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (c). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříknou se jednotlivé porovnávací roztoky a určí se plochy píků.

Sestrojí se kalibrační graf z ploch píků porovnávacích roztoků a koncentrací těchto roztoků (g/100 ml).

Nastříkne se zkoušený roztok. Porovnáním retenčních časů a ploch píků na chromatogramech porovnávacích roztoků se určí pík kyseliny glycyrrhizinové na chromatogramu zkoušeného roztoku.

Procentuální obsah kyseliny glycyrrhizinové se vypočítá ze vztahu:

$$A \cdot \frac{5}{m} \cdot B \cdot \frac{822}{840},$$

v němž značí:

A - koncentraci kyseliny glycyrrhizinové amonné soli ve zkoušeném roztoku (g/100 ml) určenou z kalibračního grafu,
B - deklarovaný obsah kyseliny glycyrrhizinové amonné soli CRL v procentech,
m - navážku drogy v gramech,
822 - molekulovou hmotnost kyseliny glycyrrhizinové,
840 - molekulovou hmotnost kyseliny glycyrrhizinové amonné soli (bezvodé).

Uchovávání

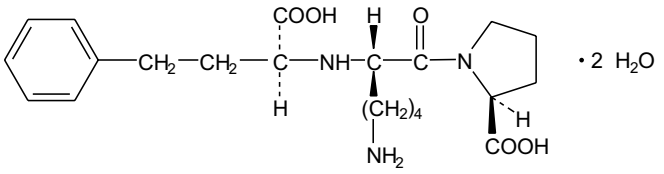
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je droga loupaná nebo neloupaná.

Lisinoprilum dihydricum

Dihydrát lisinoprilu



$C_{21}H_{31}N_3O_5 \cdot 2H_2O$ M_r 441,52 CAS 83915-83-7

M_r bezvodého 437,49

Je to dihydrát N-{N-[(1*S*)-3-fenylpropyl-1-karboxy]-L-lysyl}-L-prolinu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{21}H_{31}N_3O_5$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v acetonu a v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *dihydrátu lisinoprilu CRL.*

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -43° až -47°; počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g v *octanu zinečnatém RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *dihydrátu lisinoprilu pro test způsobilosti CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R*,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,8 ml/min je směsí mobilní fáze A a B:
  - *mobilní fáze A* - směs 30 objemových dílů *acetonitrilu R* a 970 objemových dílů *dihydrogenfosforečnanu sodného 0,02 mol/l RS*), jehož pH se upraví na hodnotu 5,0 roztokem *hydroxidu sodného R* (50 g/l),
  - *mobilní fáze B* - směs 200 objemových dílů *acetonitrilu R* a 800 objemových dílů *dihydrogenfosforečnanu sodného 0,02 mol/l RS*, jehož pH se upraví na hodnotu 5,0 roztokem *hydroxidu sodného R* (50 g/l),

Gradientový program:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0	100	0	začátek gradientu
35	70	30	konec gradientu - začátek izokratický
45	70	30	návrat k počátečním podmínkám
50 = 0	100	0	začátek dalšího gradientu

- spektrofotometrického detektoru, 210 nm,

Teplota kolony se udržuje na 50 °C.

Kolona se promývá do ustavení rovnováhy mobilní fází A nejméně 30 min. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) při nástřiku 20 µl byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Získaný chromatogram se podobá vzorovému chromatogramu dodanému s *dihydrátem lisinoprilu pro test způsobilosti CRL* v tom, že pík lisinoprilu je mezi píky lisinoprilu nečistoty A a lisinoprilu nečistoty E. Měří se výšky píků lisinoprilu nečistoty A a lisinoprilu nečistoty E nad základní linií (*A1* a *A2*) a výšky nejnižších bodů nad základní linií oddělujících tyto píky od píku lisinoprilu (*B1* a *B2*). Zkoušku lze hodnotit, jestliže výška *A1* je větší než 9násobek výšky *B1* a výška *A2* je větší než 9násobek výšky *B2*.

Je-li třeba, upraví se pH mobilní fáze na hodnotu 4,5 *kyselinou fosforečnou R* a chromatografický postup se opakuje. U některých kolon je nutné pro dostatečné rozdělení píků lisinoprilu nečistoty A, lisinoprilu a lisinoprilu nečistoty E upravit hodnotu pH na 4,0. Pokud se po této úpravě posunou retenční časy píků lisinoprilu nečistoty C a lisinoprilu nečistoty D tak, že vyhodnocení je obtížné, zvýší se obsah mobilní fáze B z 30 % na 40 % v rozmezí 35 min až 45 min od startu a tato koncen

trace se udržuje po dobu 10 min. Před dalším nástřikem se kolona promývá mobilní fází A (100 %) po dobu 10 min.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího lisinoprilu nečistotě E není větší než 0,3násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku lisinoprilu nečistoty E, není větší než 0,3násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); součet ploch všech těchto píků není větší než 0,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla, k píkům vyskytujícím se v prvních třech minutách a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 8,0 % až 9,5 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

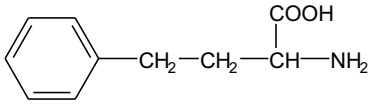
Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

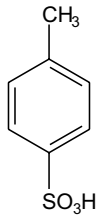
0,350 g se rozpustí v 50 ml *vody destilované R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 40,55 mg $C_{21}H_{31}N_3O_5$.

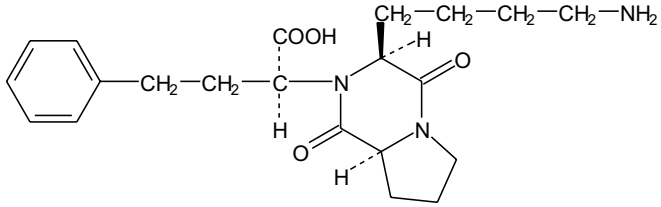
Nečistoty



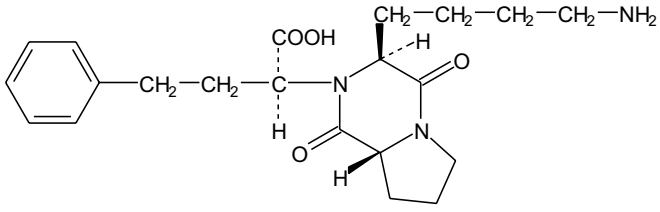
A. kyselina (*RS*)-2-amino-4-fenylbutanová,



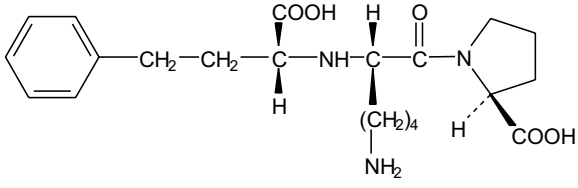
B. kyselina 4-toluensulfonová,



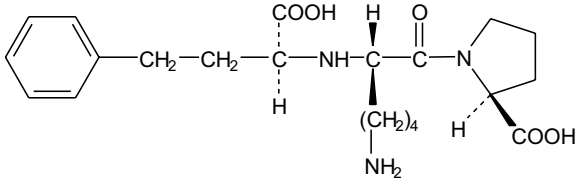
C. kyselina (*S*)-2-[(3*S*,8a*S*)-3-(4-aminobutyl)-1,2,3,4,6,7,8,8a-oktahydro-1,4-dioxopyrrolo[1,2-*a*]-piperazin-2-yl]-4-fenylbutanová (*S*,*S*,*S*-diketopiperazin),



D. kyselina (S)-2-[(3*S*,8a*R*)-3-(4-aminobutyl)-1,2,3,4,6,7,8,8a-oktahydro-1,4-dioxopirrolo[1,2-*a*]-piperazin-2-yl]-4-fenylbutanová (*R*,*S*,*S*-diketopiperazin),



E. N-{N-[(*R*)-3-fenylpropyl-1-karboxy]-L-lysyl}-L-prolin (*R*,*S*,*S*-izomer lisinoprilu),



F. N-{N-[(*S*)-3-cyklohexylpropyl-1-karboxy]-L-lysyl}-L-prolin (cyklohexylový analog).

Lithanthracis pix

N

Kamenouhelný dehet

Synonymum. Pix lithanthracis

CAS 8007-45-2

Je to dehet získaný suchou destilací kamenného uhlí, zbavený mechanických nečistot a vody.

Vlastnosti

Viskózní lesklá hnědočerná až černá tekutina, charakteristického pachu po naftalenu; na vzduchu zvolna tvrdne, hoří červeným svítivým plamenem. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mísitelný s tuky a mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Roztok S. 1 g se smíchá s 9 ml *vody R* a protřepává se 10 min. Pak se zfiltruje.

A. 5 ml roztoku S se smíchá s 0,1 ml *bromové vody R;* vznikne nažloutlý zákal.

B. Roztok S reaguje neutrálně nebo jen slabě zásaditě na lakmusový papír.

C. 0,1 g se smíchá s 5 ml *lihu 96% R*, protřepává se 5 min a pak se zfiltruje; žlutý filtrát fluoreskuje v ultrafialovém světle při 365 nm intenzivně světle modře.

D. 0,15 g se rozpustí ve 3 g *oleje podzemnicového R;* při pozorování v denním světle vznikne intenzivní žlutozelená fluorescence.

Zkoušky na čistotu

Hustota (*2.2.5*). 1,140 až 1,250 g/ml.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,00 g.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 0,3 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Lithii carbonas

Uhličitan lithný

Synonymum. Lithium carbonicum

Li_2CO_3 M_r 73,89 CAS 554-13-2

Obsahuje 98,5 % až 100,5 % Li_2CO_3.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkoušená látka zvlhčená *kyselinou chlorovodíkovou R* barví nesvítivý plamen červeně.

B. 0,2 g se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a odpaří se na vodní lázni do sucha; zbytek se rozpustí ve 3 ml *lihu 96% R.*

C. Vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se suspenduje ve 30 ml *vody destilované R* a přidáním 22 ml *kyseliny dusičné R* se rozpustí. Neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* a *vodou destilovanou R* se zředí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,25 g se suspenduje v 5 ml *vody destilované R*, rozpustí se přidáním 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 2 min se vaří. Po ochlazení se roztok zneutralizuje *hydroxidem sodným zředěným RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 25 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 g Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Hořčík *(2.4.6)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml; 6,7 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hořčík (150 μg/g).

Draslík. Nejvýše 300 μg/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se potřebným zředěním roztoku *chloridu draselného R* (500 μg K/ml).

Měří se emisní intenzita při 766,5 nm.

Sodík. Nejvýše 300 μg/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se potřebným zředěním roztoku *chloridu sodného R* (500 μg Na/ml).

Měří se emisní intenzita při 589 nm.

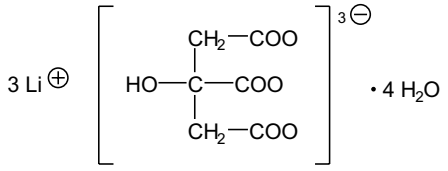
Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*, přidá se *oranž methylová RS* jako indikátor a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 36,95 mg Li_2CO_3.

† Lithii citras

Citronan lithný



$C_6H_5Li_3O_7 \cdot 4H_2O$ M_r 281,99 CAS 6080-58-6

M_r bezvodého 209,92

Je to tetrahydrát lithné soli kyseliny 2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_6H_5Li_3O_7$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkoušená látka po navhčení *kyselinou chlorovodíkovou R* barví nesvítivý plamen červeně.

B. 3 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 10 ml a přidají se 3 ml *jodistanu draselného s chloridem železitým RS;* vzniká bílá nebo žlutavě bílá sraženina.

C. K 1 ml roztoku S se přidají 4 ml *vody R.* Tento roztok vyhovuje zkoušce na citronany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS.* Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Snadno zuhelnitelné látky. K 0,20 g upráškované zkoušené látky se přidá 10 ml *kyseliny sírové R*, zahřívá se 60 min ve vodní lázni při (90 ± 1) °C a rychle se ochladí. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_2$ nebo $ZŽ_2$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Šťavelany. 0,50 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 1 g *zinku R* granulovaného a zahřívá se 1 min na vodní lázni. Potom se nechá 2 min stát, tekutina se sleje do zkumavky obsahující 0,25 ml roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l) a zahřeje se k varu. Rychle se ochladí, převede se do odměrného válce, přidá se stejný objem *kyseliny chlorovodíkové R*

a 0,25 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*. Směs se protřepe a nechá se 30 min stát; růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 4 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (0,05 g/l) (300 μg/g, počítáno jako bezvodý šťavelanový iont).

Sírany *(2.4.13)*. Ke 3 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 17 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 15 ml směsi 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 15 ml základního *roztoku na sírany (10 g SO_4/ml)*. Opalescence se hodnotí po 15 minutách.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 24,0 % až 27,0 %, stanoví se s 0,100 g. Po přidání zkoušené látky se před titrací 15 min míchá. Provede se slepá zkouška.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí zahřátím asi na 50 °C v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a ochladí se. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,25 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny žlutého zbarvení roztoku na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 7,00 mg $C_6H_5Li_3O_7$.

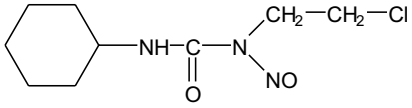
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

†† Lomustinum

1998

Lomustin



$C_9H_{16}ClN_3O_2$ M_r 233,70 CAS 13010-47-4

Je to 3-cyklohexyl-1-(2-chlorethyl)-1-nitrosomočovina. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_9H_{16}ClN_3O_2$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky se provádějí za ochrany před světlem a všechny roztoky se připravují bezprostředně před použitím.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 89 °C až 91 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 230 nm. Specifická absorbance v maximu je 250 až 270.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *lomustinu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Asi 25 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R*, přidá se 0,1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 2 ml *vody R*. Roztok se okyselí *kyselinou dusičnou zředěnou RS* přidáváním po kapkách a potom se zfiltruje. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 25 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *lomustinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *lomustinu CRL* a 10 mg *dicyklohexylmočoviny R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *toluenu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 1 h při 110 °C. Na dno chromatografické komory se umístí odpařovací miska obsahující směs objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS*, *vody R* a roztoku *manganistanu draselného R* (15 g/l) (1 + 1 + 2), komora se uzavře a nechá se 15 min stát. Poté se vysušená deska s vrstvou umístí do komory a uzavře se. Na vrstvu se nechají působit páry chloru po dobu 5 min. Deska se vyjme, nechá se v proudu chladného vzduchu, dokud není odvětrán chlor a vrstva v prostoru pod startem pokápnutá *škrobem s jodidem draselným RS* se nebarví modře. Potom se vrstva postříká *škrobem s jodidem draselným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené hlavní skvrny.

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (50 + 50), s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se odděleně po 20 μl každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (1 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,24 g se rozpustí ve 4 ml *methanolu R*, přidá se 20 ml *vody R,* nechá se 20 min stát a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 5 ml *methanolu R.* Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 5 ml *vody R* a 5 ml *methanolu R.*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0%; 1,000 g se suší 24 h v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* a při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí asi ve 3 ml *lihu 96%*, přidá se 20 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (200 g/l) a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Přidá se 75 ml *vody R* a 4 ml *kyseliny dusičné R,* ochladí se a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Současně se provede slepá zkouška.

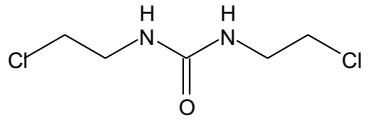
1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,37 mg $C_9H_{16}ClN_3O_2$.

Uchovávání

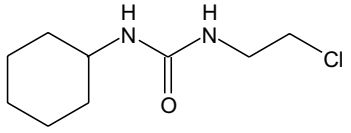
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

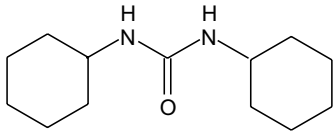
Nečistoty



A. bis(2-chlorethyl)močovina,



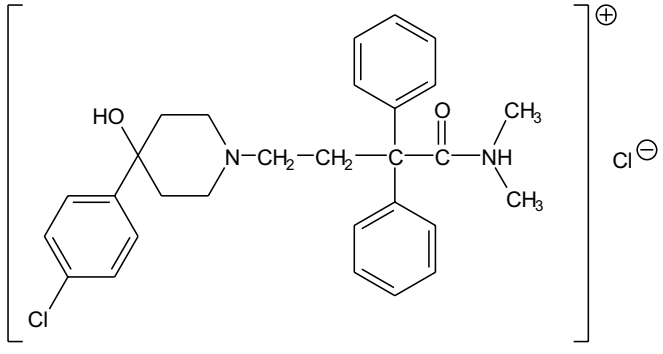
B. 1-(2-chlorethyl)-3-cyklohexylmočovina,



C. 1,3-dicyklohexylmočovina.

† Loperamidi hydrochloridum

Loperamidiumchlorid



$C_{29}H_{34}Cl_2N_2O_2$ M_r 513,51 CAS 34552-83-5

Je to N,N-dimethyl-N-{2,2-difenyl-4-[4-(4-chlorfenyl)-4-hydroxypiperidino]-1-oxo}butylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % $C_{29}H_{34}Cl_2N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 225 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *loperamidiumchloridu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *loperamidiumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.

Porovnávací roztok (b). 30 mg *loperamidiumchloridu CRL* a 30 mg *ketokonazolu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu vzduchu a potom se vystaví působení par jodu do vzniku skvrn. Pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. 50 mg se rozpustí ve směsi 0,4 ml *amoniaku 17,5% R* a 2 ml *vody R*. Směs se nechá 5 min stát a zfiltruje se. Filtrát okyselený *kyselinou dusičnou zředěnou RS* vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *loperamidiumchloridu CRL* a 2,5 mg *haloperidolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (17 g/l) (1 + 9). Složení směsi se mění lineární gradientovou elucí během 10 min tak, aby konečné složení směsi bylo 7 objemových dílů *acetonitrilu R* a 3 objemové díly roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (17 g/l); následuje eluce konečnou směsí po dobu 5 min; průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Kolona se promývá do ustavení rovnováhy po dobu nejméně 30 min *acetonitrilem R* a potom nejméně 5 min počáteční mobilní fází.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: haloperidolu asi 3 min, loperamidiumchloridu asi 4,5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem haloperidolu a píkem loperamidiumchloridu je nejméně 8,0. Je-li třeba, upraví se konečná koncentrace *acetonitridu R* v mobilní fázi nebo se upraví program lineární gradientové eluce.

Nastříkne se odděleně 10 μl *methanolu R* jako slepé zkoušky, 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku

methanolu a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g látky se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R*, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 51,35 mg $C_{29}H_{34}Cl_2N_2O_2$.

Uchovávání

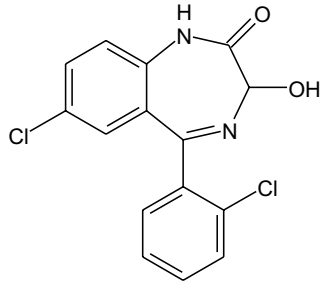
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 4-[4-(4′-chlorbifenyl-4-yl)-4-hydroxypiperidino]-N,N-dimethyl-2,2-difenylbutyramid,
B. 4-(4-chlorfenyl)-1,1′-bis[4-(dimethylamino)-4-oxo-3,3-difenylbutyl]-4-hydroxypiperidiniumbromid,
C. 4-(4-chlorfenyl)piperidin-4-ol,
D. 4-(4-hydroxy-4-fenylpiperidino)-N,N-dimethyl-2,2-difenylbutyramid,
E. 4-(4-chlorfenyl)-1-{4-[4-(4-chlorfenyl)-4-hydroxypiperidino]-2,2-difenylbutyryl}-piperidin-4- -ol.

§ Lorazepamum

Lorazepam



$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$ M_r 321,16 CAS 846-49-1

Je to (*RS*)-1,3-dihydro-3-hydroxy-7-chlor-5-(2-chlorfenyl)-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný nebo těžce rozpustný v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 210 nm až 280 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 230 nm. Specifická absorbance v maximu je 1070 až 1170.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky měřené při 600 cm^{-1} až 2000 cm^{-1} se shoduje se spektrem tablety *lorazepamu CRL*. Tablety se připraví za použití *bromidu draselného R*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*.

Deska s vrstvou se umístí do chromatografické komory a vyvíjí se *methanolem R* po dráze 17 cm, pak se usuší na vzduchu a zahřívá se 1 h při 100 °C až 105 °C.

Zkoušený roztok (a). 0,200 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *lorazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 4 mg *nitrazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se ve směru vyvíjení methanolem směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 100) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně ve vysokém vakuu při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny octové ledové R* a 30 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,12 mg $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

Nečistoty

A. 2-amino-2′,5-dichlorbenzofenon,

B. 3-acetoxy-1,3-dihydro-7-chlor-5-(2-chlorfenyl)-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-on.

Lupuli flos

1998

Chmelová šištice

Synonyma. Lupuli strobilus, Strobilus lupuli

Je to usušené, zpravidla celé samičí květenství druhu *Humulus lupulus* L.

Vlastnosti

Droga charakteristického aromatického pachu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Chmelové šištice jsou obyčejně jednotlivé, 2 cm až 5 cm dlouhé, listenaté, vejčitého tvaru, složené z četných oválných zelenožlutých, přisedlých, suchomázdřitých, překrývajících se listenů. Zevní listeny ploché, pravidelné, vnitřní listeny delší, na bázi nepravidelné, úplně uzavírající plod (nažku). Semeníky nebo řidčeji plody, báze listenů a zejména listence jsou pokryty malými oranžově žlutými žlázkami.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky listenů a listenců s mnohohrannými, nepravidelnými pokožkovými buňkami, se stěnami vlnitě zprohýbanými; jednobuněčné, kuželovité, přímé nebo zahnuté krycí chlupy s tenkými, hladkými stěnami; zřídka anomocytické průduchy; úlomky mezofylu s malými drúzami šťavelanu vápenatého; četné charakteristické oranžově žluté žláznaté chlupy s krátkou dvoubuněčnou dvouřadou nohou, nahoře pohárkovitě rozšířené; pohárkovitá část o průměru 150 μm až 250 μm je tvořena polokulovitou vrstvou sekrečních buněk, jejichž kutikula je vychlípena pryskyřičným sekretem; úlomky protáhlých sklerenchymatických buněk osemení se silnými na povrchu zvrásnělými stěnami a s četnými tečkami.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 1,0 g čerstvě upráškované drogy (355) se smíchá s 10 ml směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (3 + 7), 15 min se protřepává a pak se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 1,0 mg *červeně sudanové R*, 2,0 mg *kurkuminu R* a 2,0 mg *dimethylaminobenzaldehydu R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *ethylacetatu R* a *cyklohexanu R* (2 + 38 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou tři skvrny: v dolní čtvrtině slabě zbarvená skvrna (kurkumin), ve střední části skvrna odpovídající dimethylaminobenzaldehydu a nad ní skvrna odpovídající červeni sudanové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou četné skvrny; v poloze přibližně odpovídající skvrně kurkuminu na chromatogramu porovnávacího roztoku je slabě zbarvená skvrna (xanthohumol), v poloze přibližně odpovídající skvrně dimethylaminobenzaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrné skvrny humulonů a v poloze přibližně odpovídající skvrně červeně sudanové na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrny skvrny lupulonů. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrny lupulonů na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou zbarveny modře, skvrny humulonů hnědě a skvrna xanthohumolu je zbarvena tmavě hnědě. Vrstva se postříká *zkoumadlem fosfomolybdenan-wolframovým zředěným R* a vloží se do komory nasycené parami amoniaku; pozoruje se v denním světle. Skvrny humulonů a lupulonů na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou zbarveny modrošedě, skvrna xanthohumolu zelenošedě; na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou modrošedé až hnědošedé skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Látky extrahovatelné *lihem R* 70% *(V/V)*. 10,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 300 ml *lihu R* 70% *(V/V)* a zahřívá se 10 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje, prvních 10 ml filtrátu se odstraní. 30,0 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejméně 0,250 g (25,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

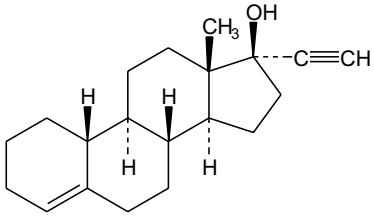
Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 12,0 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Lynestrenolum

Lynestrenol



$C_{20}H_{28}O$ M_r 284,44 CAS 52-76-6

Je to 19-nor-17α-pregn-4-en-20-in-17-ol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{28}O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 161 °C až 165 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *lynestrenolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, fluorescencí a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -9,5° až -11°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,900 g v *lihu 96% R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,125 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25 ml.
Zkoušený roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 25 mg *lynestrenolu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *heptanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *kyselinou sírovou v lihu 0,25 mol/l RS,* zahřívá se 10 min při 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější, než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 40 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 5,0 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. Bod ekvivalence se určí potenciometricky (2.2.20) za použití skleněné elektrody jako indikační a argentchloridové elektrody jako srovnávací s můstkem obsahujícím nasycený roztok *dusičnanu draselného R*. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,44 mg $C_{20}H_{28}O$.

Uchovávání

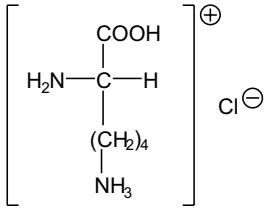
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Lysini hydrochloridum

Lysiniumchlorid

Synonymum. L-Lysinium chloratum



$C_6H_{15}ClN_2O_2$ M_r 182,65 CAS 657-27-2

Je to (*S*)-5-karboxy-5-aminopentylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{15}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *lysiniumchloridu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *vody R*, odpaří se do sucha při 60 °C a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *vody R* a 1 ml roztoku *kyseliny fosfomolybdenové R* (50 g/l); vznikne žlutavě bílá sraženina.

E. K 0,1 ml roztoku S se přidají 2 ml *vody R;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_7 nebo $ZŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +21,0° až +22,5°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *lysiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *lysiniumchloridu CRL* a 10 mg *argininu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku, usuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C do úplného odstranění amoniaku, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka sestavená ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm, která se položí okraji těsně na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg jemně upráš-

kované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 0,33 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (30 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,27 mg $C_6H_{15}ClN_2O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

2064

Macidis etheroleum

N

Muškátová silice

Synonyma. Macidis aetheroleum, Oleum macidis

Je to silice získaná ze zralých semen a míšku druhu *Myristica fragrans* HOUTT. destilací s vodní párou.

Vlastnosti

Bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu a chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, etherem a mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *myristicinu R* a 10 mg *eugenolu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,860 až 0,915 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,472 až 1,488.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +10° až +45°.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Nejvýše 0,150 g.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná ve čtyřech objemových dílech *lihu R* 90% *(V/V)*.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Macrogolum 300

Makrogol 300

Synonymum. Polyethylenglycolum 300

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(OCH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 300 (průměrná hodnota n = 6).

Vlastnosti

Čirá viskózní bezbarvá nebo téměř bezbarvá hygroskopická kapalina, mísitelná s vodou. Je velmi snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 80 mPa.s až 105 mPA.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,120 g/ml).

Hydroxylové číslo. 340 až 394. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 1,5 g (m g) zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1 \,.\, (n_2 - n_1)}{m} \,.$$

Redukující látky. K 10 ml roztoku zkoušené látky (50 g/l) se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenglykol a diethylenglykol. Nejvýše 0,4 %, počítáno jako součet obsahu ethylenglykolu a diethylenglykolu. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,10 g *ethylenglykolu R* a 0,50 g *diethylenglykolu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R,* impregnovanou 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Je-li třeba, stabilizuje se kolona zahříváním při 200 °C po dobu 15 h. Teplota vstřikovacího prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C. Počáteční teplota kolony se upraví tak, aby bylo dosaženo retenčního času pro diethylenglykol 14 min až 16 min.

Nastříkne se po 2 μl každého roztoku a teplota kolony se zvýší asi o 30 °C rychlostí 2 °C/min, ale nepřevýší 170 °C. Provede se pět opakovaných nástřiků, aby se zkontrolovala reprodukovatelnost odezvy detektoru.

Změří se plochy píků odpovídajících ethylenglykolu a diethylenglykolu na chromatogramu zkoušeného a porovnávacího roztoku. Vypočítá se obsah ethylenglykolu a diethylenglykolu ve zkoušeném roztoku.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.
Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A pro těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Macrogolum 400

Makrogol 400

Synonymum. Polyethylenglycolum 400

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H\text{-}(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_n\text{-}OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 400 (průměrná hodnota n = 8).

Vlastnosti

Čirá viskózní bezbarvá nebo téměř bezbarvá hygroskopická kapalina. Je mísitelný s vodou, velmi snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 105 mPa.s až 130 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,120 g/ml).

Hydroxylové číslo. 264 až 300. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 1,9 g (m g) zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1 \,.\, (n_2 - n_1)}{m} \,.$$

Redukující látky. K 10 ml roztoku zkoušené látky (50 g/l) se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenglykol a diethylenglykol. Nejvýše 0,4 %; počítáno jako součet obsahu ethylenglykolu a diethylenglykolu. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,10 g *ethylenglykolu R* a 0,50 g *diethylenglykolu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,8 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Je-li třeba, stabilizuje se kolona zahříváním při 200 °C po dobu 15 h. Teplota vstřikovacího prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C. Počáteční teplota kolony se upraví tak, aby bylo dosaženo retenčního času pro diethylenglykol 14 min až 16 min.

Nastříkne se po 2 μl každého roztoku a teplota kolony se zvýší asi o 30 °C rychlostí 2 °C/min, ale nepřevýší 170 °C. Provede se pět opakovaných nástřiků, aby se zkontrolovala reprodukovatelnost odezvy detektoru.

Změří se plochy píků odpovídajících ethylenglykolu a diethylenglykolu na chromatogramu zkoušeného a porovnávacího roztoku. Vypočítá se obsah ethylenglykolu a diethylenglykolu ve zkoušené kapalině.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8).* 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Macrogolum 1000

Makrogol 1000

Synonymum. Polyethylenglycolum 1000

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 1000 (průměrná hodnota n = 20).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá hygroskopická pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 22 mPa.s až 30 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 35 °C až 40 °C.

Hydroxylové číslo. 107 až 118. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 5,0 g (m g) zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1\ .\ (n_2 - n_1)}{m}\ .$$

Redukující látky. K 10 ml roztoku zkoušené látky (50 g/l) se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8).* 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Macrogolum 1500

Makrogol 1500

Synonymum. Polyethylenglycolum 1500

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 1500 (průměrná hodnota n = 30).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 34 mPa.s až 50 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 42 °C až 48 °C.

Hydroxylové číslo. 70 až 80. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 7,0 g *(m)* zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1\ .\ (n_2\ -\ n_1)}{m}\ .$$

Je-li obsah vody větší než 0,5 %, suší se zkoušený vzorek vhodné hmotnosti 2 h při 100 °C až 105 °C a stanovení hydroxylového čísla se provede s vysušeným vzorkem.

Redukující látky. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Macrogolum 3000

Makrogol 3000

Synonymum. Polyethylenglycolum 3000

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 3000 (průměrná hodnota n = 60).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 75 mPa.s až 100 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 50 °C až 56 °C.

Hydroxylové číslo. 34 až 42. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 12,0 g *(m)* zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1 \,.\, (n_2 - n_1)}{m} \,.$$

Je-li obsah vody větší než 0,5 %, suší se zkoušený vzorek vhodné hmotnosti 2 h při 100 °C až 105 °C a stanovení hydroxylového čísla se provede s vysušeným vzorkem.

Redukující látky. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Macrogolum 4000

Makrogol 4000

Synonymum. Polyethylenglycolum 4000

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 4000 (průměrná hodnota n = 80).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v lihu 96%, v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 110 mPa.s až 170 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 53 °C až 58 °C.

Hydroxylové číslo. 25 až 32. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 14,0 g *(m)* zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1 \,.\, (n_2 - n_1)}{m} \,.$$

Je-li obsah vody větší než 0,5 %, suší se zkoušený vzorek vhodné hmotnosti 2 h při 100 °C až 105 °C a stanovení hydroxylového čísla se provede s vysušeným vzorkem.

Redukující látky. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Macrogolum 6000

Makrogol 6000

Synonymum. Polyethylenglycolum 6000

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 6000 (průměrná hodnota n = 135).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v lihu 96%, v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 200 mPa.s až 270 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. 55 °C až 61 °C.

Hydroxylové číslo. 16 až 22. Do suché kuželové baňky opatřené zpětným chladičem se přenese 18,0 g *(m)* zkoušené látky. Přidá se 25,0 ml *ftalanhydridu RS*, míchá se do rozpuštění, vaří se 30 min pod zpětným chladičem na horké desce a nechá se ochladit. Chladič se opláchne nejprve 25 ml *pyridinu R* a potom 25 ml *vody R*, přidá se 1,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* do světle růžového zabarvení (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Hydroxylové číslo se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{56{,}1 \,.\, (n_2 - n_1)}{m} \,.$$

Je-li obsah vody větší než 0,5 %, suší se zkoušený vzorek vhodné hmotnosti 2 h při 100 °C až 105 °C a stanovení hydroxylového čísla se provede s vysušeným vzorkem.

Redukující látky. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, je-li rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Macrogolum 20 000

Makrogol 20 000

Synonymum. Polyethylenglycolum 20 000

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 20 000 (průměrná hodnota n = 450).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v lihu 96%, v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 2700 mPa.s až 3 500 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. Nejméně 57 °C.

Redukující látky. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.
Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu a přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, je-li rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:
A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Macrogolum 35 000

Makrogol 35 000

Synonymum. Polyethylenglycolum 35 000

CAS 25322-68-3

Je to směs polymerů obecného vzorce $H\text{-}(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_n\text{-}OH$ a odpovídající průměrné relativní molekulové hmotnosti 35 000 (průměrná hodnota n = 800).

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá pevná látka voskového nebo parafinového vzhledu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v lihu 96%, v etheru, v mastných a minerálních olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Viskozita, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. K 1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R*, uzavře se zátkou opatřenou zahnutou trubicí a zahřívá se do vývinu bílého dýmu, který se trubicí zavádí do 1 ml *chloridu rtuťnatého RS;* vznikne objemná bílá krystalická sraženina.

C. K 0,1 g se přidá 1 g *thiokyanatanu draselného R* a 1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a pečlivě se promíchá skleněnou tyčinkou. Přidá se 5 ml *dichlormethanu R* a protřepe; kapalná fáze se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 12,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,15 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Viskozita *(2.2.9)*. 11 000 mPa.s až 14 000 mPa.s (počítáno za předpokladu, že hustota je 1,080 g/ml); stanoví se s 50% roztokem zkoušené látky.

Teplota tuhnutí *(2.2.18)*. Nejméně 57 °C.

Redukující látky. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); během 10 min zbarvení manganistanu zcela nezmizí.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zásobní roztok ethylenoxidu. Zavede se 0,50 g (odpovídá asi 270 ml) plynného *ethylenoxidu R* do 100 ml *vody R*. Obsah absorbovaného ethylenoxidu (m_{EO}) se stanoví zvážením před a po absorpci. Zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Roztok se uchovává při 2 °C až 8 °C a je použitelný 14 dnů.
Pracovní roztok ethylenoxidu. 2,0 ml zásobního roztoku ethylenoxidu se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Připravuje se bezprostředně před použitím.
Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *vody R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml pracovního roztoku ethylenoxidu, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.
Porovnávací roztok (b). Do 20ml lahvičky se přenese 1 ml pracovního roztoku ethylenoxidu a přidá se 0,1 ml roztoku *acetaldehydu R* (10 mg/l), uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou, zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem a obsah lahvičky se promíchá. Nechá se stát 20 min při 80 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (150 μm až 180 μm) impregnovaným 5 % *makrogolu 20 000 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota nástřikového prostoru na 120 °C. Nastřikuje se 500 μl par nad zkoušeným roztokem a po 500 μl par nad porovnávacími roztoky (a) a (b) plynotěsnou stříkačkou z lahviček zahřátých na 80 °C.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 1,9.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T \cdot m_{EO}}{0{,}5 \cdot [(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)]},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Magnesii chloridum hexahydricum

Chlorid hořečnatý

Synonyma. Magnesium chloratum, Magnesii chloridum

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ M_r 203,30 CAS 7791-18-6

Je to hexahydrát chloridu hořečnatého. Obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Vlastnosti

Bezbarvé hygroskopické krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně fenolové RS*. Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Bromidy. 2,0 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml *vody R*, 2,0 ml *červeně fenolové RS3,* 1,0 ml *chloraminu T RS2* a ihned se zamíchá. Přesně po 2 min se přidá 0,30 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l RS* a zředí se na 10,0 ml *vodou R.* Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 590 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 5,0 ml roztoku *bromidu draselného R* 3 mg/l (500 μg/ml).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena pro výrobu roztoků pro peritoneální dialýzu, hemodialyzačních roztoků nebo hemofiltračních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník.

4 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (1 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Kontrolní roztok se připraví za použití směsi 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 1 ml roztoku S se zředí na 15 ml *vodou destilovanou R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Draslík. Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků, vyhovuje zkoušce na draslík, obsahuje-li nejvýše 500 μg/g K; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,144 g *chloridu draselného R* sušeného 3 h při 100 °C až 105 °C se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml (600 μg K/ml). Zředí se podle potřeby.

Měří se emisní intenzita při 768 nm.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *vody R*. Provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,33 mg $MgCl_2 . 6H_2O$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu roztoků pro peritoneální dialýzu, hemodialyzačních roztoků nebo hemofiltračních roztoků,
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků.

Magnesii hydroxidum

Hydroxid hořečnatý

$Mg(OH)_2$ M_r 58,32 CAS 1309-42-8

Obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $Mg(OH)_2$.

Vlastnosti

Bílý jemný amorfní prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, která po protřepání se zkoušenou látkou zásaditě reaguje na fenolftalein. Rozpouští se ve zředěných kyselinách.

Zkouška totožnosti

Asi 15 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Roztok vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve směsi 50 ml *kyseliny octové R* a 50 ml *vody destilované R;* při rozpouštění jen nepatrně šumí. Roztok se 2 min vaří, ochladí se a zředí na 100 ml *kyselinou octovou zředěnou RS*. Pokud je třeba, přefiltruje se přes předem vyžíhaný a zvážený porcelánový nebo křemenný filtrační kelímek vhodné porozity, aby byl získán čirý filtrát.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_3 *(2.2.2, Metoda II)*.

Rozpustné látky. 2,00 g se smíchají se 100 ml *vody R* a vaří se 5 min. Horká tekutina se přefiltruje přes filtr ze slinutého skla (40), ochladí se a zředí na 100 ml *vodou R*. 50 ml filtrátu se odpaří do sucha a suší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 20 mg (2,0 %).

Látky nerozpustné v kyselině octové. Případný zbytek získaný při přípravě roztoku S promytý, vysušený a vyžíhaný při 600 °C váží nejvýše 5 mg (0,1 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S se zředí na 15 ml *vodou R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %).

Sírany *(2.4.13)*. 0,6 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou destilovanou R* vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,5 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 1,3 ml roztoku S se zředí na 150 ml *vodou destilovanou R*. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na vápník (1,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, 2 min se třepe s 25 ml *isobutylmethylketonu R* a nechá se stát. Vodná vrstva se oddělí, odpaří se do sucha a zbytek se rozpustí v 15 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,15 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (0,07 %).

Ztráta žíháním. 30,0 % až 32,5 %; 0,5 g se zahřívá postupně na 900 °C a vyžíhá se do konstantní hmotnosti.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,832 mg $Mg(OH)_2$.

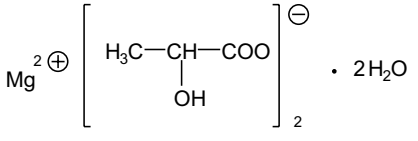
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Magnesii lactas dihydricus

N

Dihydrát mléčnanu hořečnatého



$C_6H_{10}O_6Mg \cdot 2H_2O$ M_r 238,4

M_r bezvodého 202,5

Je to dihydrát hořečnaté soli kyseliny (*S*)-2-hydroxypropionové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{10}O_6Mg$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve vroucí vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Vyhovuje zkoušce na mléčnany *(2.3.1)*.

C. Vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se jí zředí na 100 ml.

Roztok S1. 5,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě destilované R* a po ochlazení se jí zředí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH. 7,5 až 9,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -9° až -11°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S1 se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Vápník. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na vápník (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy *(10 μg/g)*. K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 12,0 % až 15,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 125 °C. Vysušená látka se použije ke Stanovení obsahu.

Stanovení obsahu

0,100 g vysušené látky se rozpustí zahřátím ve *vodě R*, zředí se jí na 200 ml a provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,12 mg $C_6H_{10}O_6Mg$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Magnesii oxidum leve

Lehký oxid hořečnatý

MgO M_r 40,30 CAS 1309-48-4

Vyžíhán předepsaným způsobem, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny MgO.

Vlastnosti

Jemný bílý amorfní prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, která po protřepání se zkoušenou látkou reaguje zásaditě na fenolftalein. Rozpouští se ve zředěných kyselinách s nejvýše slabým šuměním.

Zdánlivý objem: 15 g zaujímá objem asi 150 ml.

Zkouška totožnosti

Asi 15 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Roztok vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve směsi 70 ml *kyseliny octové R* a 30 ml *vody destilované R*, vaří se 2 min, ochladí se a zředí *kyselinou octovou zředěnou RS* na 100 ml. Pokud je třeba, přefiltruje se přes předem vyžíhaný a zvážený porcelánový nebo křemenný filtrační kelímek vhodné porozity, aby byl získán čirý filtrát.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_2 *(2.2.2, Metoda II)*.

Rozpustné látky. K 2,00 g se přidá 100 ml *vody R* a 5 min se vaří. Horká tekutina se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (40), ochladí se a zředí *vodou R* na 100 ml. 50 ml filtrátu se odpaří do sucha a vysuší při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 20 mg (2,0 %).

Látky nerozpustné v kyselině octové. Případný zbytek, získaný při přípravě roztoku S, promytý, vysušený a vyžíhaný při 600 °C, váží nejvýše 5 mg (0,1 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,7 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,15 %).

Sírany *(2.4.13)*. 0,3 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou destilovanou R* vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1,0 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 1,3 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 150 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na vápník (1,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 20 ml roztoku S se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, 2 min se třepe s 25 ml *isobutylmethylketonu R* a nechá se stát. Po oddělení vrstev se vodná vrstva odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 1,5 ml *kyseliny octové R* a zředí se na 30 ml *vodou R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 50 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovují limitní zkoušce na železo (0,1 %).

Ztráta žíháním. Nejvýše 8,0 %; 1,00 g látky se žíhá při 900 °C.

Stanovení obsahu

0,700 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. S 10,0 ml tohoto roztoku se provede chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,030 mg MgO.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Magnesii oxidum ponderosum

Těžký oxid hořečnatý

MgO M_r 40,30 CAS 1309-48-4

Vyžíhán předepsaným způsobem, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny MgO.

Vlastnosti

Jemný bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, která po protřepání se zkoušenou látkou reaguje zásaditě na fenolftalein. Rozpouští se ve zředěných kyselinách s nejvýše slabým šuměním.

Zdánlivý objem: 15 g zaujímá objem asi 30 ml.

Zkouška totožnosti

Asi 15 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zneutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Roztok vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve směsi 70 ml *kyseliny octové R* a 30 ml *vody destilované R*, vaří se 2 min, ochladí se a zředí na 100 ml *kyselinou octovou zředěnou RS*. Pokud je třeba, přefiltruje se přes předem vyžíhaný a zvážený porcelánový nebo křemenný filtrační kelímek vhodné porozity, aby byl získán čirý filtrát.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_3 *(2.2.2, Metoda II)*.

Rozpustné látky. K 2,00 g se přidá 100 ml *vody R* a vaří se 5 min. Horká tekutina se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (40), ochladí se a zředí *vodou R* na 100 ml. 50 ml filtrátu se odpaří do sucha a vysuší při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 20 mg (2,0 %).

Látky nerozpustné v kyselině octové. Případný zbytek získaný při přípravě roztoku S, promytý, vysušený a vyžíhaný při 600 °C, váží nejvýše 5 mg (0,1 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %).

Sírany *(2.4.13)*. 0,3 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou destilovanou R* vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1,0 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 1,3 ml roztoku S se zředí na 150 ml *vodou destilovanou R*. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na vápník (1,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 20 ml roztoku S se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a třepe se 2 min s 25 ml *isobutylmethylketonu R*. Po oddělení vrstev se vodná vrstva odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 30 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,15 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (0,07 %).

Ztráta žíháním. Nejvýše 8,0 %; 1,00 g látky se žíhá při 900 °C.

Stanovení obsahu

0,700 g se rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. S 10,0 ml tohoto roztoku se provede chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,030 mg MgO.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Magnesii peroxidum

N

Peroxid hořečnatý

Synonymum. Magnesium peroxydatum

CAS 1335-26-8

Je to směs peroxidu hořečnatého (MgO_2; M_r 56,30) a oxidu hořečnatého (MgO; M_r 40,30). Obsahuje 24,0 % až 27,0 % sloučeniny MgO_2.

Vlastnosti

Lehký jemný bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěné kyselině octové.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 8 ml *vody R*. 1 ml tohoto roztoku se třepe s 5 ml *etheru R* a 0,5 ml *dichromanu draselného RS1;* etherová vrstva se zbarví modře.

B. Asi 0,015 g se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zneutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS;* roztok vyhovuje zkoušce na hořčík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. K 5,0 g se opatrně přidá 25 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a roztok se odpaří až na objem 2 ml až 3 ml. Zbytek se rozpustí ve směsi stejných dílů *kyseliny octové R* a *vody destilované R* a zředí se touto směsí na 100 ml. Pokud roztok není čirý, přefiltruje se přes předem vysušený a zvážený skleněný filtr.

Roztok S2. 5 ml roztoku S1 se zředí *vodou destilovanou R* na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S1 není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok H_6 (*2.2.2, Metoda II*).

Látky nerozpustné v kyselině octové. Případná sraženina z roztoku S1 se promyje, usuší a vyžíhá při 600 °C. Vyžíhaný zbytek váží nejvýše 5 mg (0,1 %).

Kysele a zásaditě reagující látky. 2,00 g se rozpustí ve 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá k varu a horký roztok se přefiltruje. Po ochlazení se filtrát zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml. K 15,0 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok se zbarví červeně. Titruje se z mikrobyrety *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS*. Spotřeba není vyšší než 0,10 ml.

Rozpustné soli. 50 ml filtrátu ze zkoušky Kysele nebo zásaditě reagující látky se odpaří do sucha. Zbytek vysušený při 100 °C až 105 °C váží nejvýše 10 mg (1,0 %).

Chloridy (*2.4.4*). 0,10 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 μg/g).

Sírany (*2.4.13*). 3 ml roztoku S1 se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (2,5 mg/g).

Arsen (*2.4.1*). 5 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Vápník (*2.4.3*). 1 ml roztoku S2 se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (10 mg/g).

Železo (*2.4.9*). 2 ml roztoku S2 se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (500 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). K 20,0 ml roztoku S1 se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 2 min se třepe s 25 ml *isobutylmethylketonu R.* Vodná fáze se oddělí a odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 1,5 ml *kyseliny octové R* a *vodou R* se zředí na 30,0 ml. 12,0 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova* (*1 μg Pb/ml*).

Stanovení obsahu

0,200 g se opatrně rozpustí ve 20 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, přidá se 20 ml *vody R* a titruje se *manganistanem draselným 0,02 mol/l VS* do stálého slabě fialového zbarvení.

1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* odpovídá 2,816 g MgO_2.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí, nejvýše 3 roky bez nového stanovení obsahu.

Magnesii stearas

Stearan hořečnatý

Synonymum. Magnesium stearicum

CAS 557-04-0

Stearan hořečnatý [$(C_{17}H_{35}COO)_2Mg$; M_r 591,25] může obsahovat proměnlivá množství palmitanu hořečnatého [$(C_{15}H_{31}COO)_2Mg$; M_r 535,14] a olejanu hořečnatého [$(C_{17}H_{33}COO)_2Mg$; M_r 587,22]. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 3,8 % až 5,0 % Mg.

Vlastnosti

Bílý velmi jemný lehký prášek, mastný na omak. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Zbytek získaný při přípravě roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, nemá teplotu tuhnutí *(2.2.18)* nižší než 53 °C.

B. 1 ml roztoku S vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 5,0 g se přidá 50 ml *etheru R*, 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 20 ml *vody destilované R* a zahřívá se pod zpětným chladičem až do úplného rozpuštění. Pak se ochladí a přenese do dělicí nálevky. Vodná vrstva se oddělí a etherová vrstva se protřepe dvakrát 4 ml *vody destilované R*. Vodné výtřepky se spojí s vodnou vrstvou, promyjí se 15 ml *etheru R* a zředí na 50 ml *vodou destilovanou R* (roztok S). Organická vrstva se odpaří do sucha a zbytek se vysuší při 100 °C až 105 °C.

Vzhled roztoku. Roztok S se nezbarví intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Vzhled roztoku mastných kyselin. 0,5 g zbytku získaného při přípravě roztoku S se rozpustí v 10 ml *chloroformu R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 1,0 g se přidá 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 1 min se vaří za stálého třepání, pak se ochladí a přefiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Číslo kyselosti mastných kyselin *(2.5.1)*. 195 až 210; stanoví se za použití 0,200 g zbytku získaného při přípravě roztoku S a rozpuštěného ve 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Chloridy *(2.4.4)*. 2 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovují limitní zkoušce na chloridy (250 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,3 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou destilovanou R* vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 6,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

K 0,750 g ve 250ml kuželovité baňce se přidá 50 ml směsi stejných objemových dílů *1-butanolu R* a *ethanolu R*, 5 ml *amoniaku 26% R*, 3 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0*, 30,0 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* a 15 mg *černě eriochromové T s chloridem sodným R*. Zahřeje se na 45 °C až 50 °C a titruje *síranem zinečnatým 0,1 mol/l VS* z modrého zbarvení na fialové. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,431 mg Mg.

Magnesii subcarbonas levis

Lehký zásaditý uhličitan hořečnatý

CAS 39409-82-0

Je to hydratovaný zásaditý uhličitan hořečnatý. Obsahuje 40,0 % až 45,0 % sloučeniny MgO (M_r 40,30).

Vlastnosti

Bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpouští se ve zředěných kyselinách za silného šumění.

Zdánlivý objem: 15 g zaujímá objem asi 180 ml.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

B. Asi 15 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Roztok vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve 100 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Když ustane šumění, vaří se 2 min, ochladí se a zředí na 100 ml stejnou kyselinou. Pokud je třeba, přefiltruje se přes předem vyžíhaný a zvážený porcelánový nebo křemenný filtrační kelímek vhodné porozity, aby byl získán čirý filtrát.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_4 *(2.2.2, Metoda II)*.

Rozpustné látky. 2,00 g se smíchají se 100 ml *vody R* a vaří se 5 min. Za horka se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (40), nechá se ochladit a zředí se *vodou R* na 100 ml. 50 ml filtrátu se odpaří do sucha a suší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 10 mg (1,0 %).

Látky nerozpustné v kyselině octové. Případný zbytek získaný při přípravě roztoku S promytý, vysušený a vyžíhaný při 600 °C váží nejvýše 2,5 mg (0,05 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 1,5 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,07 %).

Sírany *(2.4.13)*. 1 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,3 %).

Arsen *(2.4.2)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 2,6 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 150 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na vápník (0,75 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 20 ml roztoku S se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*, třepe se 2 min s 25 ml *isobutylmethylketonu R* a nechá se stát. Vodná vrstva se oddělí a odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. 2,5 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (400 μg/g).

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 20 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,030 mg MgO.

Magnesii subcarbonas ponderosus

Těžký zásaditý uhličitan hořečnatý

CAS 39409-82-0

Je to hydratovaný zásaditý uhličitan hořečnatý. Obsahuje 40,0 % až 45,0 % sloučeniny MgO (M_r 40,30).

Vlastnosti

Bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný ve zředěných kyselinách za silného šumění.

Zdánlivý objem: 15 g zaujímá objem asi 30 ml.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

B. Asi 15 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a neutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS*. Roztok vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve 100 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Když ustane šumění, vaří se 2 min, ochladí se a zředí na 100 ml stejnou kyselinou. Pokud je třeba, přefiltruje se přes předem vyžíhaný a zvážený porcelánový nebo křemenný filtrační kelímek vhodné porozity, aby byl získán čirý filtrát.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_4 *(2.2.2, Metoda II)*.

Rozpustné látky. 2,00 g se smíchají se 100 ml *vody R* a vaří se 5 min. Za horka se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (40), nechá se ochladit a zředí se *vodou R* na 100 ml. 50 ml filtrátu se odpaří do sucha a suší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 10 mg (1,0 %).

Látky nerozpustné v kyselině octové. Případný zbytek získaný při přípravě roztoku S promytý, vysušený a vyžíhaný při 600 °C váží nejvýše 2,5 mg (0,05 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 1,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,07 %).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,6 %).

Arsen *(2.4.2)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 2,6 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 150 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na vápník (0,75 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 20 ml roztoku S se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a třepe se 2 min s 25 ml *isobutylmethylketonu R* a nechá se stát. Vodná vrstva se oddělí a odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. 2,5 ml tohoto roztoku zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (400 μg/g).

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 20 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,030 mg MgO.

Magnesii sulfas

Síran hořečnatý

Synonymum. Magnesium sulfuricum

$MgSO_4 . 7H_2O$ $_r$ 246,47 CAS 10034-99-8

$_r$ bezvodého 120,36

Je to heptahydrát síranu hořečnatého. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $MgSO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo lesklé bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný ve vroucí vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na sírany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně fenolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 1,7 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (300 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 g Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 48,0 % až 52,0 %; 0,500 g se suší v sušárně 1 h při 110 °C až 120 °C a pak při 400 °C do konstantní hmotnosti.

Stanovení obsahu

0,450 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,04 mg $MgSO_4$.

Magnesii trisilicas

Trikřemičitan hořečnatý

Synonymum. Magnesium trisilicicum

CAS 39365-87-2

Je to sloučenina proměnlivého složení odpovídající přibližně vzorci $Mg_2Si_3O_8 . nH_2O$. Počítáno na vyžíhanou látku, obsahuje nejméně 29,0 % oxidu hořečnatého (MgO; M_r 40,30) a nejméně 65,0 % oxidu křemičitého (SiO_2; M_r 60,08).

Vlastnosti

Bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 0,25 g vyhovuje zkoušce na křemičitany *(2.3.1)*.

B. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zneutralizuje *hydroxidem sodným zředěným RS;* roztok vyhovuje zkoušce na hořčík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 2,0 g se přidá směs 4 ml *kyseliny dusičné R* a 4 ml *vody destilované R*. Za častého třepání se zahřeje k varu, přidá se 12 ml *vody destilované R* a nechá se ochladit. Filtruje se nebo odstřeďuje, až se získá čirý roztok, který se zředí *vodou destilovanou R* na 20 ml.

Zásaditě reagující látky. K 10,0 g ve 200ml kuželové baňce se přidá 100,0 g *vody R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se doplní na původní hmotnost *vodou R*, nechá se stát a přefiltruje se nebo odstřeďuje, až se získá čirá kapalina. K 10 ml kapaliny se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Soli rozpustné ve vodě. 20,0 ml kapaliny získané ve zkoušce Zásaditě reagující látky se odpaří v platinové misce na vodní lázni do sucha. Zbytek vyžíhaný při 900 °C do konstantní hmotnosti váží nejvýše 30 mg (1,5 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 5 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)* a 10 ml *vody R.*

Sírany *(2.4.13)*. 0,3 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,5 %).

Arsen *(2.4.2)*. 2,5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 7,5 ml roztoku S se zneutralizuje *amoniakem zředěným RS1* za použití *žluti metanilové RS* jako vnějšího indikátoru, zředí se *vodou R* na 15 ml, a je-li potřeba, přefiltruje se. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (40 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml).*

Ztráta žíháním. 17 % až 34 %; 0,5 g se žíhá při 900 °C do konstantní hmotnosti v platinovém kelímku.

Neutralizační mohutnost. 0,25 g se suspenduje v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*, zředí se jí na 100,0 ml a nechá se 2 h stát ve vodní lázni při (37 ± 0,5) °C za častého protřepávání. Po ochlazení se k 20,0 ml roztoku nad usazeninou přidá 0,1 ml *modře bromfenolové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do modrého zbarvení. Neutralizační mohutnost je nejméně 100,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* na 1 g.

Stanovení obsahu

Oxid hořečnatý. K 1,000 g ve 200ml kuželové baňce se přidá 35 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 60 ml *vody R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se přefiltruje, kuželová baňka a filtr se promyjí *vodou R* a spojené promývací vody a filtrát se zředí *vodou R* na 250,0 ml. 50,0 ml tohoto roztoku se zneutralizuje *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* (asi 8 ml). Provede se chelatometrická titrace hořčíku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,030 mg MgO.

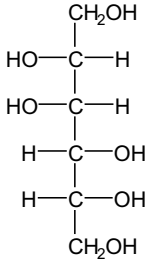
Oxid křemičitý. K 0,700 g se přidá 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 10 ml *vody R* a 1,5 h se zahřívá na vodní lázni za častého protřepávání a dodávání odpařené vody. Ochladí se a dekantuje přes kvantitativní filtr (průměr 7 cm). Sraženina se promyje dekantací třikrát vždy 5 ml horké *vody R*, přenese se na filtr a promývá se horkou *vodou R* tak dlouho, až 1 ml filtrátu zůstane po přidání 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 2 ml *chloridu barnatého RS1* čirý. Filtr i s obsahem (SiO_2) se žíhá v platinovém kelímku při 900 °C do konstantní hmotnosti.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Mannitolum

Mannitol



$C_6H_{14}O_6$ M_r 182,17 CAS 69-65-8

Je to D-mannitol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_6H_{14}O_6$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 165 °C až 170 °C.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *mannitolu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (10 + 20 + 70) po dráze 17 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *kyselinou 4-aminobenzoovou RS*. Potom se vrstva suší v proudu studeného vzduchu do vymizení pachu acetonu, 15 min se zahřívá při 100 °C a po ochlazení se postříká roztokem *jodistanu draselného R* (2 g/l). Vrstva se znovu suší v proudu studeného vzduchu a 15 min se zahřívá při 100 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Ke 3 ml čerstvě připraveného roztoku *pyrokatecholu R* (100 g/l) se za chlazení ve vodě s ledem přidá 6 ml *kyseliny sírové R*. Ke 3 ml ochlazené směsi se přidá 0,3 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, a asi 30 s se opatrně zahřívá nad plamenem; vzniká růžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,05 ml *fenolftaleinu RS*. Po přidání nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na růžové. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,05 ml *červeně methylové RS*. Po přidání nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na červené.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +23° až +25°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený takto: 2,00 g zkoušené látky a 2,6 g *tetraboritanu sodného R* se rozpustí v asi 20 ml *vody R* ohřáté na 30 °C a třepe se nepřetržitě 15 min až 30 min bez dalšího zahřívání. Výsledný čirý roztok se zředí *vodou R* na 25,0 ml.

Redukující cukry. 5,00 g se rozpustí mírným zahřátím ve 25 ml *vody R*, ochladí se a přidá se 20 ml *citronanu měďnatého RS* a několik skleněných kuliček. Směs se během 4 min uvede do varu a vaří se 3 min. Rychle se ochladí a přidá se 100 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 2,4% *(V/V)* a 20,0 ml *jodu 0,025 mol/l VS*. Za stálého protřepávání se přidá 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (6 + 94). Po rozpuštění sraženiny se nadbytek jodu titruje *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátor. Při titraci se spotřebuje nejméně 12,8 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS*.

Sorbitol. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití 0,75mm vrstvy následující směsi: 0,1 g *carbomeru R* se smíchá se 110 ml *vody R* a nechá se 1 h stát za opatrného míchání. Za stálého třepání se upraví pH na hodnotu 7 postupným přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS*

a poté se přidá 30 g *silikagelu H R*. Deska s vrstvou se zahřívá 1 h při 110 °C, nechá se vychladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. K 0,5 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 10 ml *lihu 96% R*, 30 min se třepe a zfiltruje se.

Porovnávací roztok. 25 mg *sorbitolu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se 5 h směsí objemových dílů roztoku *kyseliny borité R* (2 g/l), *2-propanolu R* (15 + 85). Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C, po vychladnutí se postříká roztokem *manganistanu draselného R* (5 g/l) v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zahřívá se 2 min při 100 °C. Skvrna odpovídající sorbitolu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (2,0 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. Roztok S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Olovo *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce Olovo v cukrech (0,5 μg/g). Zkoušená látka se rozpustí ve 150,0 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Nikl *(2.4.15)*. Vyhovuje limitní zkoušce Nikl v polyolech (1 μg/g). Zkoušená látka se rozpustí ve 150,0 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,0 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li:
- nejvýše 4 m.j. endotoxinu v gramu pro parenterální přípravky obsahující méně než 100 g/l mannitolu,
- nejvýše 2,5 m.j. endotoxinu v gramu pro parenterální přípravky obsahující 100 g/l nebo více mannitolu.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml roztoku se přidá 20,0 ml roztoku *jodistanu sodného R* (21,4 g/l) a 2,0 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se na vodní lázni přesně 15 min. Po ochlazení se přidají 3 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a za okamžik 25,0 ml *arsenitanu sodného 0,1 mol/l VS*. Po promíchání se přidá 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l) a nechá se 15 min stát. Titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do objevení prvního žlutého zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 1,822 mg $C_6H_{14}O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné, nejvyšší koncentrace bakteriálních endotoxinů.

Marrubii herba

N

Jablečníková nať

Synonymum. Herba marrubii

Je to usušená kvetoucí nať druhu *Marrubium vulgare* L.

Vlastnosti

Droga slabého aromatického pachu, hořké chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek tupě čtyřhranný, bělovlnatý, s krátkými nekvetoucími větévkami. Listy křižmostojné, řapíkaté, okrouhle vejčité, na bázi zaokrouhlené až srdčité, horní listy široce klínovité. Všechny listy vroubkované, podle žilnatiny svraskalé, na svrchní straně řídce chlupaté, na spodní straně chlupaté až plstnaté, s žilnatinou silně vyniklou. Květy v paždí horních listů uspořádány v kulovitých, oddálených lichopřeslenech. Listence šídlovité, vlnaté, kalich trubkovitý, desetižilný, vlnatě pýřitý s deseti stejně dlouhými, za plodu nazpět ohnutými ušty. Koruna bílá, pýřitá, delší než kalich, dvoupyská, horní pysk dvouklaný, dolní široký, třícípý.

B. Pokožka stonku s buňkami na vnější straně ztlustlými, s četnými krycími jednobuněčnými nebo jednořadými až šestibuněčnými tenkostěnnými chlupy a hvězdovitými chlupy s až dvaceti větvemi. Žláznaté chlupy jednořadé, s menší jednobuněčnou až dvoubuněčnou hlavičkou nebo větší dvoubuněčnou až čtyřbuněčnou hlavičkou a žláznaté chlupy (typ Lamiaceae) s osmibuněčnou hlavičkou. Hypodermis kolenchymatická, v hranách stonku až desetiřadá. Parenchymatické buňky primární kůry obsahují zejména u mladších stonků chlorofyl. Kruh cévních svazů je přerušován pruhy parenchymu. Dřevo husté, s jednořadými dřeňovými paprsky. Cévy o průměru až 25 μm, provázeny četnými sklerenchymatickými vlákny.

Pokožka listu z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými, s průduchy (*2.8.3*) diacytického typu (četnější na spodní straně listu). Chlupy stejného typu jako na stonku. Hvězdovité chlupy přisedlé nebo s krátkou jednobuněčnou nohou.

List bifaciální, palisádový parenchym jednořadý, houbový parenchym víceřadý s jehlicemi nebo svazky rafidů šťavelanu vápenatého.

Kalich a koruna se stejnými typy chlupů jako stonek. Na vnitřní straně kalicha jsou kromě toho dvoubuněčné až tříbuněčné, silně ztlustlé, až 1 mm dlouhé krycí chlupy. Pylová zrna kulovitá, se třemi klíčními póry a třemi zářezy, s hladkou exinou.

C. Droga se upráškuje (355). Prášek je světlý, šedavě hnědozelený tvořící chuchvalce. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: krycí jednobuněčné nebo jednořadé až šestibuněčné chlupy a hvězdovité chlupy s až dvaceti rameny; žláznaté chlupy s jednobuněčnou až čtyřbuněčnou hlavičkou a žláznaté chlupy (typ Lamiaceae) nebo jejich úlomky; úlomky pokožky listů s průduchy diacytického typu (*2.8.3*), v buňkách houbového parenchymu jehlice nebo svazky rafidů šťavelanu vápenatého; kulatá pylová zrna se třemi klíčními póry, trikolpátní, s hladkou exinou.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se roztok zfiltruje.

Na vrstvu se nanese do pruhu (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *zkoumadlem vanilinovým R* a suší se 5 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části intenzivní fialová skvrna (premarrubin) a nad ní intenzivně červenofialová skvrna (marrubin). Na chromatogramu mohou být další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 3 % stonků silnějších než 3 mm.

Záměny. Nejsou přítomny:
- rostliny měkce chlupaté až vlnaté, s listy hrubě vroubkovanými, svraskalými, na líci olysalými, s lichopřesleny krátce stopkatými, listenci blanitými nebo štětinovitými, kalichem vlnatým, s ušty osinkatými, kopinatými, s korunou červeně fialovou zřídka skoro bílou, v ústí s věnečkem chlupů, s prostředním cípem dolního pysku vykrojeným (*Ballota nigra* L.),
- rostliny aromatické, hustě a krátce plstnaté, s listy vroubkovaně pilovitými, na spodní straně šedoplstnatými, s listeny šídlovitými, s kalichem s ušty čárkovitě kopinatými, korunou špinavě bílou až načervenalou, pýřitou, s prostředním cípem dolního pysku červeně tečkovaným (*Nepeta cataria* L.),
- rostliny vlnatě šedoplstnaté až běloplstnaté, nežláznaté, listy na bázi srdčitě vroubkované, na spodní straně bílošedě plstnaté, na svrchní straně zelené, listeny kopinaté, delší než 15 mm. Kališní ušty nestejné, krátce trnitě osténkaté, koruna světle červená, vně vlnatá, prostřední cíp velký (*Stachys germanica* L.),
- rostliny šedě až bíle přitiskle plstnaté, odstále prutnatě větvené, listy krátce řapíkaté na bázi klínovité, vroubkovaně pilovité, na obou stranách běloplstnaté, listence kratičké, šídlovité, kalich přitiskle plstnatý, pětiuštý, ušty kopinatě šídlovité, přímé nebo rozestálé, koruna delší než kalich, bílá (*Marrubium peregrinum* L.).

Ztráta sušením (*2.3.32*). Nejvýše 10,0 %. 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 3,0 %.

Číslo hořkosti. Nejméně 2000. Provádí se srovnáním s chininiumchloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000. Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění, které chutná ještě hořce.

Základní roztok chininiumchloridu. 0,100 g *chininiumchloridu R* se rozpustí ve 100,0 ml *vody R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 1,00 g práškované drogy (710) se přelije 1000 ml vroucí *vody R* a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml. Důkladně se promíchá, zfiltruje se a prvních 20 ml filtrátu se odstraní.

Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 4,2 ml základního roztoku chininiumchloridu a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Určí se roztok nejnižší koncentrace, který chutná ještě hořce. 10,0 ml roztoku nejnižší koncentrace se 30 s

převaluje v ústech tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka. Jestliže roztok nechutná hořce, vyplivne se a po 1 min se ústa vypláchnou vodou. Po 10 min se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor *k* se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{5{,}00}{n},$$

v němž značí:

n - počet ml základního roztoku chininiumchloridu, který chutnal ještě hořce.

10/*k* ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 20,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku chutná hořce.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Matricariae flos

Heřmánkový květ

Synonymum. Flos chamomillae

Je to usušený úbor druhu *Matricaria recutita* L. (*Chamomilla recutita* (L.) RAUSCHERT). Obsahuje nejméně 4 ml modře zbarvené silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga má charakteristický, příjemný a aromatický pach. Rozkvetlý úbor se skládá ze zákrovu s četnými listeny sestavenými v jedné až třech řadách; protáhle kuželovitého lůžka, někdy i polokulovitého (mladé úbory), dvanácti až dvaceti obvodových jazykovitých květů s bílou ligulou a velkého množství žlutých trubkovitých květů.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listeny zákrovu jsou obvejčité až kopinaté s hnědošedým blanitým okrajem. Květní lůžko kuželovité, duté, bez plevin. Jazykovité květy na bázi světle žluté až hnědožluté, trubkovité, nahoře protažené v protáhle oválný, bílý jazyk. Koruna trubkovitých květů žlutá, nahoře rozšířená, ukončená pěti cípy, báze květů žlutohnědá až hnědá.

B. Úbor se rozdělí na jednotlivé části. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Droga je charakteristická těmito znaky: listeny zákrovu na okraji s blanitým lemem, tvořeným jednoduchou vrstvou radiálně protáhlých buněk; střední část listenu obsahující chlorofyl je kryta na spodní straně pokožkou s protáhlými buňkami, se stěnami vlnitě zprohýbanými; s průduchy a žláznatými chlupy. Svazky cévní obklopeny četnými protáhlými, tečkovanými sklereidami s poměrně velkým luminem. Při plošném pohledu je pokožka koruny jazykovitých a trubkovitých květů tvořena izodiametrickými nebo protáhlými buňkami s více či méně zvlněnými stěnami, s malým množstvím žláznatých chlupů. Pokožka jazykovitých květů na svrchní straně s papilóz-

ně vychlípenými buňkami, s kutikulou paprsčitě zvrásněnou. V mezofylu mohou být někdy malé drúzy šťavelanu vápenatého. V mezofylu probíhají čtyři hlavní žilky rovnoběžně s podélnou osou květu, někdy jsou doprovázeny dalšími jednou nebo dvěma žilkami, které jsou kratší a jsou rovnoběžné s hlavními žilkami. Dvě prostřední žilky se rozbíhají do dvou nejbližších cípů květu, laterální žilky anastomozují po dvou a tvoří tři oblouky ve třech koncových cípech jazyka. Semeníky vejčité až kulovité, u obou typů květů je na bázi jednořadý věnec kamenných buněk. Pokožka semeníku z protáhlých buněk se stěnami zvlněnými, mezi nimiž jsou vloženy žláznaté chlupy. Semeníky obsahují četné, velmi malé drúzy šťavelanu vápenatého. V trubkovi tých květech je každá nitka tyčinky obklopena na bázi věncem kamenných buněk. Pokožka bli zen je silně papilózní. Pylová zrna o průměru asi 30 μm, okrouhlá a trojboká, se třemi klíčními póry a ostnitou exinou.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g drogy se hrubě rozetře v porcelánové třence a převede se na chromatografický sloupec 150 mm dlouhý, s vnitřním průměrem 15 mm, droga se v sloupci lehce stlačí skleněnou tyčinkou. Třenka i těrka se omyjí dvakrát 10 ml *dichlormethanu R*, promývací tekutina se převede na sloupec. Perkolát se jímá do baňky s dlouhým úzkým hrdlem, rozpouštědlo se odpaří na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 10 mg *borneolu R*, 20 mg *bornylacetatu R* a 4 mg *guajazulenu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se *chloroformem R* po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je řada skvrn. Největší skvrna (spiroether) odpovídá svojí polohou skvrně bornylacetatu na chromatogramu porovnávacího roztoku, další skvrna je v blízkosti startu (matricin). Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C, pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou následující skvrny: v dolní třetině hnědožlutá skvrna (borneol), která se během několika hodin barví fialovošedě, ve střední části žlutohnědá až šedá skvrna (bornylacetat) a v horní třetině temně rudá skvrna s modrým okrajem (guajazulen). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tyto skvrny: modrá skvrna (matricin) v blízkosti startu, několik fialovočervených skvrn (jedna z nich odpovídá bisabololu) v poloze vymezené skvrnami borneolu a bornylacetatu na chromatogramu porovnávacího roztoku, nahnědlá skvrna (spiroether) odpovídající polohou skvrně bornylacetatu, červené skvrny (terpeny) polohou odpovídající skvrně guajazulenu, ve střední a v dolní části chromatogramu zkoušeného roztoku jsou další skvrny.

D. 0,1 ml zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti C se převede do zkumavky a smíchá se s 2,5 ml roztoku připraveného rozpuštěním 0,25 g *p-dimethylaminobenzaldehydu R* ve směsi složené z 5 ml *kyseliny fosforečné R*, 45 ml *kyseliny octové R* a 45 ml *vody R*. Zahřívá se 2 min na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe s 5 ml *etheru petrolejového R*. Spodní vrstva se zbarví zřetelně zelenomodře nebo modře.

Zkoušky na čistotu

Rozdrcená droga. Nejvýše 25 % drogy může projít sítem č. 710.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 13,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). Použije se 30 g nerozdrobněné drogy, baňka na 1000 ml, 300 ml *vody R* jako destilační tekutiny a 0,50 ml *xylenu R* v dělené trubici. Destiluje se 4 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Maydis amylum

Kukuřičný škrob

Synonymum. Amylum maydis

CAS 9005-25-8

Získává se z obilek druhu *Zea mays* L.

Vlastnosti

Matně bílý až slabě nažloutlý velmi jemný prášek, vrzající při tření mezi prsty, bez chuti. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě a v lihu 96%.

Zrna s trhlinami na okrajích nebo nepravidelnými hranami se vyskytují zcela výjimečně.

Zkoušky totožnosti

A. Mikroskopie. Mnohostěnná, hranatá zrna o průměru 2 μm až 23 μm, nebo okrouhlá zrna o průměru 25 μm až 32 μm. Středová trhlina je tvořena zřetelnou dutinou nebo je dvoupaprsčitá až pětipaprsčitá, vrstvení není patrné. V polarizovaném světle se středová trhlina jeví jako černý kříž.

B. 1 g se suspenduje v 50 ml *vody R.* 1 min se vaří a pak se ochladí; tvoří se řídký, zakalený sliz.

C. K 1 ml slizu ze zkoušky totožnosti B se přidá 0,05 ml *jodu RS1;* vznikne tmavě modré zbarvení, které zahřátím zmizí a po ochlazení se opět objeví.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. Ke 100 ml *lihu* 70% (*V/V*) předem zneutralizovaného po přidání 0,5 ml *fenolftaleinu RS* se přidá 10 g zkoušené látky, 1 h se protřepává a pak se zfiltruje. Ke změně zbarvení 50 ml filtrátu se spotřebují nejvýše 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Cizí příměsi. Mohou být přítomny pouze stopy buněčných stěn a protoplazmy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,6 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

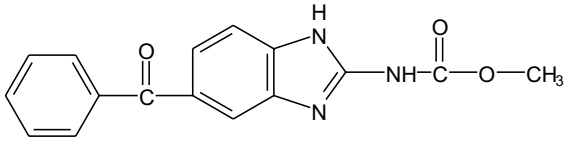
Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^3 bakterií a 10^2 plísní v gramu; stanoví se plotnovou metodou (*2.6.12*); vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* (*2.6.13*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Mebendazolum

Mebendazol



$C_{16}H_{13}N_3O_3$ M_r 295,30 CAS 31431-39-7

Je to methylester kyseliny N-(5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)karbamové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{13}N_3O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96%, v etheru a v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

A. 30,0 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a zředí se *2-propanolem R* na 100,0 ml. 2,5 ml tohoto roztoku se zředí *2-propanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 320 nm proti roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* 0,05% *(V/V)* v *2-propanolu R* jako kontrolní kapalině; roztok vykazuje dvě absorpční maxima: při 247 nm a 312 nm. Specifická absorbance v maximu při 247 nm je 940 až 1040 a v maximu při 312 nm je 485 až 535.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *mebendazolu CRL*. Měří se látky bez rekrystalizace.

C. K asi 10 mg se přidá 5 ml *lihu 96% R,* 1 ml *dinitrobenzenu RS* a 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vznikne intenzivní žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok $HŽ_4$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.

Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 100 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *dichlormethanu R* (5 + 5 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a přidá se 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,53 mg $C_{16}H_{13}N_3O_3$.

Uchovávání

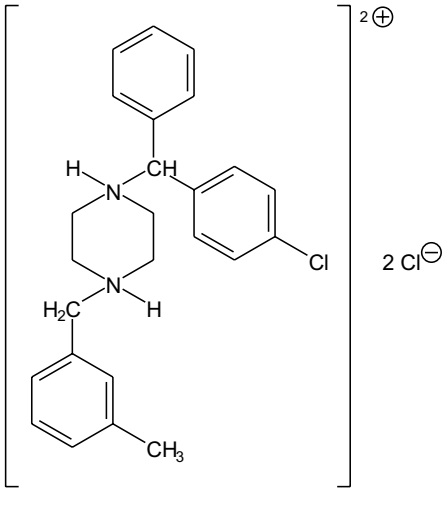
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Meclozini dihydrochloridum

Mekloziniumdichlorid

Synonymum. Meclozini hydrochloridum



$C_{25}H_{29}Cl_3N_2$ M_r 463,88 CAS 1104-22-9

Je to (*RS*)-1-(4-chlorbenzhydryl)-4(3-methylbenzyl) piperaziniumdichlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{25}H_{29}Cl_3N_2$.

Vlastnosti

Žlutý nebo žlutavě bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 15,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 232 nm a slabou absorbanci bez definovaného maxima při 260 nm až 300 nm. Specifická absorbance v maximu je 345 až 380, počítáno na bezvodou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mekloziniumdichloridu CRL.* Měří se tablety s *chloridem draselným R.*

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 15 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R.* Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,50 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Vypočítá se množství kyselých nebo zásaditých látek ze spotřeby titračního roztoku ve zkoušce Stanovení obsahu podle vzorce:

$$A = V_2 - 2V_1,$$

v němž značí:
V_1 - spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* do prvního inflexního bodu v mililitrech,
V_2 - spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* do druhého inflexního bodu v mililitrech.
A je -0,3 ml až +0,3 ml pro 0,3500 g zkoušené látky.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *meklozinium dichloridu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 l každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, methanolu R, toluenu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 5 + 30 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS.* Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku(b) (0,5 %).Ke žlutavě bílým skvrnám na startu se nepřihlíží.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3500 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 46,39 mg $C_{25}H_{29}Cl_3N_2$.

Uchovávání

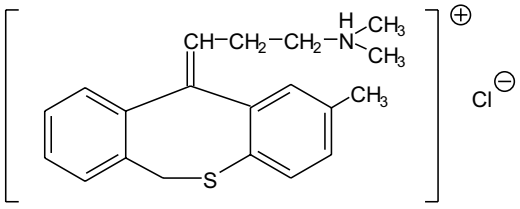
Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Medosulepini hydrochloridum

N

Medosulepiniumchlorid

Synonymum. Chlorid medosulepinia



$C_{20}H_{24}ClNS$ M_r 345,93 CAS 53046-96-1

Je to (*E*)-[3-(2-methyl-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-11-yliden)propyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{24}ClNS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý mikrokrystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *medosulepiniumchloridu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku retenční čas hlavního píku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

C. Asi 2 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové R* a nechá se 5 min stát; vznikne hnědozelené zbarvení.

D. Asi 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 0,25 ml *amoniaku zředěného RS1* a vzniklá sraženina se odfiltruje. 2 ml filtrátu vyhovují zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 0,625 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Roztok S2. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S1 je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH. 4,0 až 5,0, měří se roztok S2.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu za použití následujících roztoků. *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí pomocí ultrazvukové lázně (asi 3 min) v 8 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku rozpouštědel, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,1 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku rozpouštědel, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *kyselině dusičné 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky obsahující 0,2 μg Fe/ml, 0,5 μg Fe/ml a 0,8 μg Fe/ml zředěním základního *roztoku železa (20 μg Fe/ml) kyselinou dusičnou 0,1 mol/l RS*.

Změří se absorbance roztoků při 248,3 nm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen. Nula na přístroji se nastaví za použití *kyseliny dusičné 0,1 mol/l RS*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví těsně před použitím*.

Zkoušený roztok. 4,0 mg se rozpustí za použití ultrazvukové lázně (asi 3 min) v 8 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15,0 mg *kyseliny 2-(4-tolylmerkaptomethyl)benzoové CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). Je směsí stejných objemových dílů porovnávacího roztoku ze zkoušky Příbuzné látky a porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku ze zkoušky Příbuzné látky se zředí *methanolem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 4,0 mg *medosulepiniumchloridu CRL* se rozpustí za použití ultrazvukové lázně (asi 3 min) v 8 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) se specifickou plochou 220 m^2/g a velikostí póru 100 nm,
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následovně: 2 g *pentansulfonanu sodného R* se rozpustí v 600 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny octové R*, upraví se pH směsi *cyklohexylaminem R* na hodnotu 6,0, zfiltruje se, zředí se *vodou R* na 640 ml a smíchá se s 260 ml *acetonitrilu R* a 100 ml *2-propanolu R*. Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 231 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C. Nastříkne se 25 µl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem kyseliny 2-(4-tolylmerkaptomethyl)benzoové a medosulepiniumchloridu je nejméně 8.

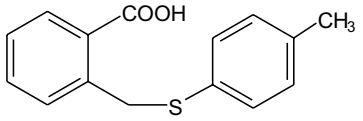
Nastříkne se pětkrát 25 µl zkoušeného roztoku a 25 µl porovnávacího roztoku (d) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času medosulepiniumchloridu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch hlavních píků na 5 chromatogramech zkoušeného roztoku není větší než 2,0.

Z ploch hlavních píků na chromatogramu zkoušeného a porovnávacího roztoku, koncentrací roztoků, skutečného obsahu *medosulepiniumchloridu CRL* se vypočítá obsah $C_{20}H_{24}ClNS$ v procentech a přepočte se na vysušenou látku.

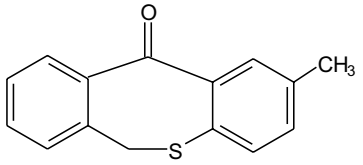
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

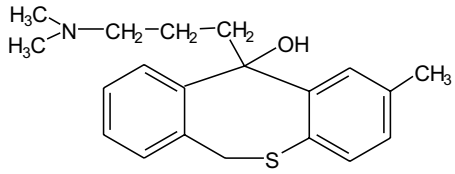
Nečistoty



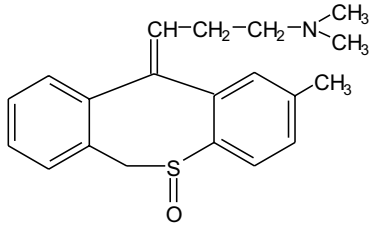
A. kyselina 2-(4-tolylthiomethyl)benzoová,



B. 2-methyl-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-11-on,



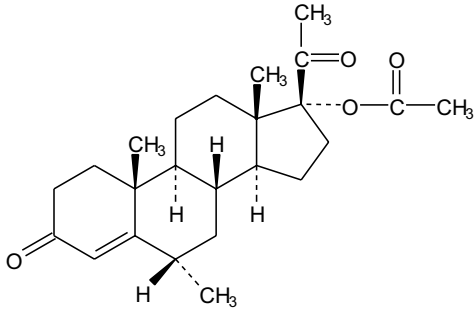
C. (*RS*)-2-methyl-11-(3-dimethylaminopropyl)-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]thiepin-11-ol,



D. (*E*)-2-methyl-11-(3-dimethylaminopropyliden)-6*H*-dibenzo[*b,e*]thiepin-5-oxid.

† Medroxyprogesteroni acetas

Medroxyprogesteronacetat



$C_{24}H_{34}O_4$ M_r 386,53 CAS 71-58-9

Je to 17-hydroxy-6α-methyl-4-pregnen-3,20-dion-17-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{24}H_{34}O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96% a v methanolu a těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 205 °C až 209 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *medroxyprogesteronacetatu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenční přísadou pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *medroxyprogesteronacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *progesteronu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru petrolejového R*, *ethylacetatu R* a *toluenu R* (10 + 40 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny. Vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min při 120 °C nebo až do objevení skvrn. Po ochlazení se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +45° až +51°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *medroxyprogesteronacetatu CRL* a 25 mg *megestrolacetatu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se odpaří ve vodní lázni při 45 °C do sucha, zbytek se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: 600 ml *acetonitrilu R* a 350 ml *vody R* se promíchá a po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Citlivost se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) činila 70 % až 90 % celé stupnice zapisovače.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min. Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: medroxyprogesteronacetatu 13,5 min a megestrolacetatu 12,5 min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky megestrolacetatu a medroxyprogesteronacetatu je nejméně 2,0. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu R* v mobilní fázi tak, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení.

Nastříkne se odděleně pětkrát 20 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) není větší než 2,0.

Odděleně se nastříkne 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

25,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku v maximu při 241 nm.

Vypočítá se obsah $C_{24}H_{34}O_4$ za použití specifické absorbance, jejíž hodnota je 426.

Uchovávání

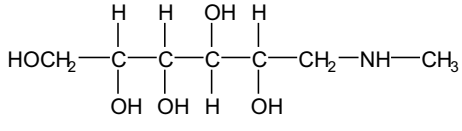
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Megluminum

N

Meglumin



$C_7H_{17}NO_5$ M_r 195,21 CAS 6284-40-8

Je to 1-deoxy-1-methylamino-D-glucitol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_7H_{17}NO_5$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Vodný roztok reaguje na lakmus zásaditě. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 128 °C až 131 °C.

B. Infračervené spektrum (*2.2.25)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *megluminu CRL*.

C. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidají se asi 2 mg *ninhydrinu R* a zahřívá se 2 min na vodní lázni; roztok se zbarví modrofialově.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 3,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -16,5° až -18°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,5 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Redukující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidá stejný objem *vínanu měďnatého RS* a krátce se povaří; nevznikne hnědočervená sraženina.

Těžké kovy (*2.4.8*). 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 12 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*.). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 40 ml *vody R* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,52 mg $C_7H_{17}NO_5$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Melissae herba

N

Meduňková nať

Synonymum. Herba melissae

Je to usušená, na začátku květu sbíraná nať druhu *Mellisa officinalis* L. Obsahuje nejméně 0,7 ml silice v 1 kg drogy.

Vlastnosti

Droga slabého charakteristického pachu po citronu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek čtyřhranný, žláznatě chlupatý až téměř lysý, zelenošedý, ve spodní části hnědě naběhlý. Listy dlouze řapíkaté, široce vejčité až kosočtverečné, na bázi široce klínovité až uťaté, hrubě pilovitě zubaté, krátce zašpičatělé. Čepel tenká, pomačkaná, slabě chlupatá až olysalá, na svrchní straně s žilnatinou vpadlou. Na spodní straně světlejší, s ostře vyniklou světlou žilnatinou, chlupy jen na silnějších žilkách. Lichopřesleny málokvěté, v paždí listenů listům podobných, ale menších. Listence vejčité až čárkovité. Květy stopkaté. Kalich zvonkovitý, třináctižilný, dvoupyský, horní pysk třízubý, dolní osinkatě dvouzubý. Koruna žlutobílá, později růžová, trubka zakřivená, nálevkovitá, v ústí lysá, horní pysk vykrojený, dolní třícípý. Tyčinky lysé.

B. Pokožka stonku s buňkami na vnější straně ztlustlými. Krycí chlupy jednobuněčné, velmi krátké, široce kuželovité, mírně zahnuté, na povrchu jemně zrnité, dvoubuněčné až pětibuněčné, krátké, ztlustlé, mírně zahnuté, na povrchu zrnité nebo jemně rýhované. Žláznaté chlupy (typ Lamiaceae), malé chlupy s jednobuněčnou nohou a s jednobuněčnou až dvoubuněčnou hlavičkou. Hypodermis kolenchymatická, v hranách stonku mnohořadá. Parenchymatické buňky primární kůry obsahují zejména u mladších stonků chlorofyl. Svazky cévní uspořádány v kruhu přerušovaném dřeňovými paprsky. Pokožka listu na obou stranách z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými, krytými tenkou, hladkou kutikulou. Chlupy stejného typu jako na stonku, četnější na svrchní straně. Průduchy diacytického typu (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu. List bifaciální. Palisádový parenchym jednořadý, houbový parenchym třířadý až čtyřřadý s velkými intercelulárami. Pylová zrna kulovitá, se šesti klíčními póry a síťovitou exinou.

C. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: krycí chlupy jednobuněčné, široce kuželovité, na povrchu jemně zrnité; dvoubuněčné až šestibuněčné jednořadé krycí chlupy na povrchu jemně zrnité nebo rýhované, na konci zašpičatělé; žláznaté chlupy (typ Lamiaceae) a chlupy s jednobuněčnou nohou a jednobuněčnou až dvoubuněčnou hlavičkou; úlomky pokožky listy s diacytickými průduchy (*2.8.3*).

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se protřepává 5 min s 10 ml *dichlormethanu R* a pak se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí malým množstvím *dichlormethanu R*. Spojené tekutiny se opatrně odpaří na vodní lázni na asi 0,5 ml.

Porovnávací roztok. 5 μl *citralu R* a 5 μl *(+)-citronellalu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; mohou být i další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 5 % stonků silnějších než 5 mm.

Záměny. V droze nejsou přítomny listy na obou stranách chlupaté až plstnaté (*Nepeta cataria* L.) nebo dlouhé kopinaté listy s ostře pilovitými okraji; v práškované droze nejsou patrné drúzy nebo krystaly šťavelanu vápenatého (*Stachys sp.*).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %. 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 1,5 %.

Stanovení obsahu

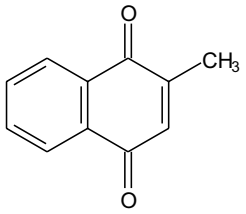
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.3.12*). 50,0 g drogy se destiluje 3 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 1000ml baňce s 500 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Menadionum

Menadion



$C_{11}H_8O_2$ M_r 172,18 CAS 58-27-5

Je to 2-methyl-1,4-naftochinon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_8O_2$.

Vlastnosti

Světle žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v toluenu, dobře rozpustný v etheru a mírně rozpustný v lihu 96% a v methanolu. Na světle se rozkládá.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 105 °C až 108 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *menadionu CRL.*

C. Asi 1 mg se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R* a přidají se 2 ml *amoniaku 17,5% RS* a 0,2 ml *ethylkyanoacetatu R;* vzniká intenzivní modrofialové zbarvení, které se po přidání 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* odbarví.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R,* přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se ve vodní lázni; vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za chránění před přímým světlem*. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *nitromethanu R*, *acetonu R*, *dichlorethanu R* a *cyklohexanu R* (1 + 2 + 5 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu horkého vzduchu a vyvíjení a vysušení se ještě dvakrát opakuje. Potom se vrstva pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h nad *oxidem fosforečným R* a při tlaku nepřevyšujícím 2 kPa až 3 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny octové ledové R* v baňce opatřené zátkou s ventilem. Po přidání 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 1 g *zinku práškového R* se baňka uzavře a nechá 60 min stát za občasného protřepání a za chránění před světlem. Tento roztok se zfiltruje přes vatu, třikrát se promyje vždy 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. K filtrátu spojenému s promývací tekutinou se přidá 0,1 ml *feroinu RS* a ihned se titruje *hexanitratoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,61 mg $C_{11}H_8O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Menthae piperitae etheroleum

Silice máty peprné

Synonyma. Menthae piperitae aetheroleum, Oleum menthae piperitae

CAS 8006-90-4

Je to silice získaná z čerstvé natě kvetoucí rostliny druhu *Mentha* x *piperita* L. destilací s vodní parou.

Vlastnosti

Bezbarvá nažloutlá nebo lehce zelenožlutá tekutina, charakteristického pachu, chladivé chuti. Je mísitelná s lihem 96%, etherem a dichlormethanem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s přísadou fluorescenčního indikátoru pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *thymolu R*, 10 μl *menthylacetatu R*, 20 μl *cineolu R* a 50 mg *mentholu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 10 μl porovnávacího roztoku a 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být skvrny (karvon, pulegon), které se nacházejí těsně pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a přitom se pozoruje v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou následující skvrny (podle vzestupných hodnot R_F): v dolní třetině chromatogramu intenzivní modrá až fialová skvrna (menthol), fialově modrá až hnědá skvrna (cineol), růžová skvrna (thymol) a fialově modrá skvrna (menthylacetat). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je velmi intenzivní skvrna odpovídající mentholu a slabě zbarvená skvrna odpovídající cineolu. Mezi skvrnami cineolu a thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku mohou být světle růžové, šedomodré nebo zelenošedé skvrny (karvon, pulegon, isomenthon); ve střední části chromatogramu je fialově modrá skvrna (menthylacetat), bezprostředně pod ní je zelenomodrá skvrna (menthon); v blízkosti čela chromatogramu je intenzivní fialově červená skvrna (uhlovodíky) a pod ní hnědožlutá skvrna (menthofuran); dále mohou být patrné další, méně intenzivně zbarvené skvrny.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografický profil, viz Zkoušky na čistotu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenční časy hlavních píků retenčním časům hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku. Píky karvonu a pulegonu mohou na chromatogramu zkoušeného roztoku chybět.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 1,4; 5,0 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Hustota (*2.2.5*). 0,900 až 0,916.

Index lomu (*2.2.6*). 1,457 až 1,467.

Optická otáčivost (*2.2.7*). Úhel optické otáčivosti je -10° až -30°.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice (*2.8.7*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Chromatografický profil. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. Zkoušená látka.
Porovnávací roztok. 0,1 g *limonenu R*, 0,2 g *cineolu R*, 0,4 g *menthonu R*, 0,1 g *menthofuranu R*, 0,1 g *isomenthonu R*, 0,4 g *menthylacetatu R*, 0,6 g *mentholu R*, 0,2 g *pulegonu R* a 0,1 g *karvonu R* se rozpustí v 1 ml *hexanu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 60 m a vnitřního průměru 0,25 mm s vnitřní stěnou pokrytou *makrogolem 20 000 R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1,5 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- dělicího poměru 1/100,
- programované teploty; teplota kolony se udržuje po dobu 10 min na 60 °C, pak se zvyšuje rychlostí 2 °C/min až na 180 °C, při níž se udržuje 5 min,
- teploty nástřikového prostoru a detektoru 220 °C.

Nastříkne se 0,2 μl porovnávacího roztoku. Při dodržení předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí uvedeném ve složení porovnávacího roztoku. Zaznamenají se retenční časy těchto látek.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže počet teoretických pater je nejméně 30 000, počítáno pro pík limonenu, při teplotě 110 °C a je-li rozlišení píků limonenu a cineolu nejméně 1,5.

Nastříkne se asi 0,2 μl zkoušeného roztoku. Porovnáním retenčních časů píků na chromatogramu zkoušeného roztoku s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku se identifikují látky, které jsou přítomny ve zkoušeném roztoku (nepřihlíží se k píku odpovídajícímu hexanu).

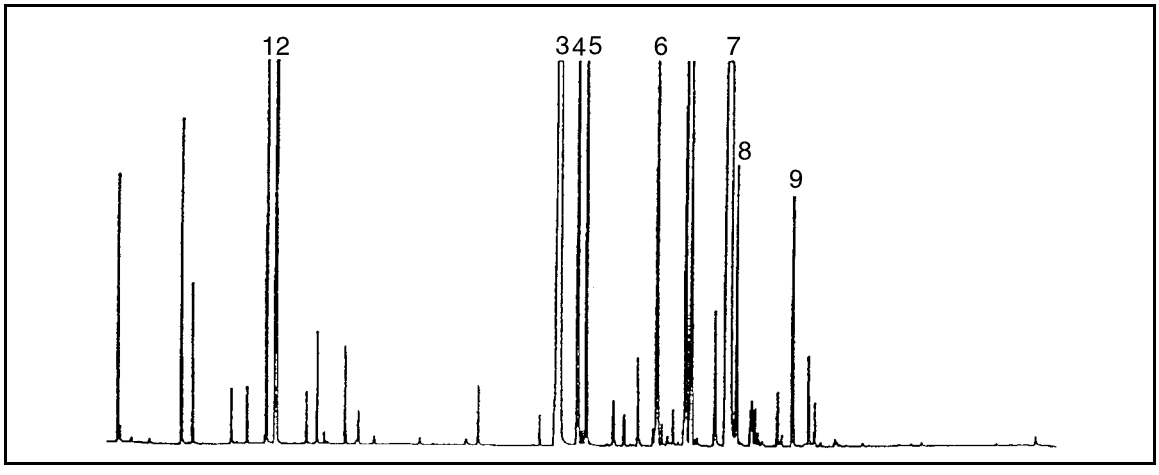
Obsah jednotlivých látek v procentech se vypočítá metodou vnitřní normalizace. Obsah látek v procentech se pohybuje v rozmezí:

limonen	1,0 % až 5,0 %
cineol	3,5 % až 14,0 %
menthon	14,0 % až 32,0 %
menthofuran	1,0 % až 9,0 %
isomenthon	1,5 % až 10,0 %
menthylacetat	2,8 % až 10,0 %
menthol	30,0 % až 55,0 %
pulegon	nejvýše 4,0 %
karvon	nejvýše 1,0 %

Poměr obsahu cineolu k obsahu limonenu je větší než 2.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem a teplem.



Obr. 1. Vzorový chromatogram silice máty peprné

Vzor chromatogramu je uveden pro informaci a jako návod při aplikaci analytické metody. Netvoří součást požadavků článku.

1. limonen	4. menthofuran	7. menthol
2. cineol	5. isomenthon	8. pulegon
3. menthon	6. menthylacetat	9. karvon

Menthae piperitae folium

List máty peprné

Synonymum. Folium menthae piperitae

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Mentha* x *piperita* L. Neřezaná droga obsahuje nejméně 12 ml silice v kilogramu drogy. Řezaná droga obsahuje nejméně 9 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga má charakteristický a pronikavý pach a aromatickou chuť.

List je zelený až hnědozelený, u některých odrůd s hnědofialovou žilnatinou. Řapíky jsou zelené až hnědofialové.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. List celý, rozlámaný nebo řezaný, tenký, křehký. Celý list je 3 cm až 9 cm dlouhý a 1 cm až 3 cm široký, často svraštělý. Čepel vejčitá nebo kopinatá, v horní části zašpičatělá, na bázi nesouměrná, s okrajem ostře pilovitým. Žilnatina zpeřená, na spodní straně vyniklá, postranní žilky svírají s hlavní žilkou úhel 45°. Spodní strana čepele slabě pýřitá, žláznaté chlupy jsou pod lupou (6x) patrné jako světle žluté body. Rýhovaný řapík zpravidla o průměru až 1 mm, je obvykle 0,5 cm až 1 cm dlouhý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky listu s pokožkovými buňkami při plošném pohledu se stěnami vlnitě zprohýbanými, kutikula nad žilnatinou zvrásněná, diacytické průduchy četnější na spodní straně listu; úlomky pokožky okraje listu s izodiametrickými buňkami se stěnami přímými, výrazně tečkovanými; krycí chlupy krátké, kuželovité, jednobuněčné nebo dvoubuněčné, nebo protáhlé, jednořadé ze tří až osmi buněk se zvrásněnou kutikulou. Žláznaté chlupy dvojího typu: (a) jednobuněčná noha s malou okrouhlou jednobuněčnou hlavičkou o průměru 15 μm až 25 μm; (b) jednobuněčná noha s protáhlou oválnou hlavičkou o průměru 55 μm až 70 μm, složenou z osmi paprsčitě uspořádaných buněk; úlomky dorziventrálního mezofylu s jednořadým palisádovým parenchymem a čtyřřadým až šestiřadým houbovým parenchymem; nažloutlé krystaly mentholu patrné pod kutikulou sekrečních buněk. Krystaly šťavelanu vápenatého nejsou přítomny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF $_{254}$R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g drogy se upráškuje v čas potřeby a protřepává se několik minut s 2 ml *dichlormethanu R*, pak se zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha při teplotě nepřesahující 40 °C, zbytek se rozpustí v 0,1 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 50 mg *mentholu R*, 20 μl *cineolu R*, 10 mg *thymolu R* a 10 μl *menthylacetatu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 10 μl porovnávacího roztoku a 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být slabě zbarvená skvrna (karvon, pulegon), která se nachází pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS*, zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a při tom se pozoruje v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v pořadí podle vzestupné hodnoty R_F skvrny: v dolní třetině tmavomodrá až fialová (menthol), fialovo-modrá až hnědá (cineol), růžová (thymol), modravě fialová (menthylacetat). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny mentholu (velmi intenzivní) a cineolu (slabě zbarvená) odpovídající polohou a zbarvením skvrnám těchto látek na chromatogramu porovnávacího roztoku; v poloze vymezené skvrnami cineolu a thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku mohou být skvrny: světle růžová (karvon), modrošedá (pulegon), šedozelená (isomenthon). Ve střední části je modravě fialová skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně menthylacetatu, bezprostředně pod ní je zelenomodrá skvrna (menthon); v blízkosti čela chromatogramu je intenzivní červenofialová skvrna (uhlovodíky); na chromatogramu mohou být další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Stanoví se s 10 g drogy.

Jiné části matečné rostliny. Nejvýše 5 % stonků; průměr stonku je nejvýše 1,5 mm.

Cizí organické příměsi. Nejvýše 2 %. Nejvýše 8 % listů vykazujících stopy po napadení *Puccinia menthae*.

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 11,0 %; stanoví se s 20,0 g drogy.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 15,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 1,5 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). Použije se 20,0 g rozdrcené drogy, baňka na 500 ml, 200 ml *vody R* jako destilační tekutiny a 0,50 ml *xylenu R* v dělené trubici. Destiluje se 2 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Menthae piperitae herba

N

Nať máty peprné

Synonymum. Herba menthae piperitae

Je to usušená kvetoucí nať druhu *Mentha* x *piperita* L. Obsahuje nejméně 0,8 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga charakteristického pachu po mentholu, aromatické chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek přímý, v horní polovině větvený, lysý nebo roztroušeně chlupatý, tupě čtyřhranný, nahnědle zelený, často fialově naběhlý. Listy řapíkaté (řapík až 15 mm dlouhý), kopinaté, vejčitě kopinaté až vejčité, ostře špičaté, na bázi zúžené nebo uťaté, na okraji ostře pilovité. Jsou křehké, roztroušeně chlupaté až téměř lysé, pouze na žilkách na spodní straně listu krycí chlupy, často fialově naběhlé, s žilnatinou na spodní straně mírně vyniklou. Květy ve vrcholových, hustých, vejčitých až kuželovitých lichoklasech. Stopky květní krátké s četnými drobnými papilami. Listeny malé, čárkovité. Kalich úzce trubkovitý, ušty úzce trojúhelníkovité, řídce, ale dlouze chlupaté. Trubka kalicha třináctižilná, v ústí lysá, vně žláznatá s drobnými papilami. Koruna světle růžová až světle fialová, slabě souměrná, dvoupyská, se čtyřmi skoro stejnými cípy, horní cíp větší, často vykrojený. Prašníky zpravidla zakrnělé.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka stonku z buněk mnohohranných, na vnější straně ztlustlých s bradavčitou kutikulou. Hypodermis kolenchymatická, v hranách stonku mnohořadá. Parenchymatické buňky primární kůry obsahují zejména u mladších stonků chlorofyl. Kolaterální cévní svazky uspořádány v uzavřeném kruhu. Cévy tečkovaně a šroubovitě ztlustlé. Dřeňové paprsky jednořadé. V parenchymu dřeně drobné krystalky šťavelanu vápenatého.

Pokožka listu na obou stranách z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými. Diacytické průduchy (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu. Krycí chlupy krátké, široce kuželovité, jednobuněčné až dvoubuněčné, na povrchu bradavčité; jednořadé tříbuněčné až osmibuněčné krycí chlupy až 600 μm dlouhé s jemně bradavčitou nebo rýhovanou kutikulou; žláznaté chlupy s jednobuněč-

nou až dvoubuněčnou nohou a jednobuněčnou hlavičkou jsou až 40 μm dlouhé; žláznaté chlupy (typ Lamiaceae) s hlavičkou o průměru 55 μm až 70 μm, složenou z osmi buněk. List bifaciální. Palisádový parenchym jednořadý, houbový parenchym čtyřřadý až šestiřadý, šťavelan vápenatý chybí.

C. Práškovaná droga. Zelený až hnědozelený prášek. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky a ztlustlé hypodermis stonku, parenchymatické buňky primární dřeně s drobnými krystaly šťavelanu vápenatého; úlomky pokožky listu s diacytickými průduchy (*2.8.3*); krycí chlupy kuželovité, s bradavčitou kutikulou; jednořadé mnohobuněčné chlupy s kutikulou jemně bradavčitou nebo rýhovanou, nebo jejich úlomky; žláznaté chlupy s jednobuněčnou až dvoubuněčnou nohou a oválnou hlavičkou a žláznaté chlupy (typ Lamiaceae).

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g drogy se upráškuje (355) v čas potřeby a protřepává se několik minut s 2 ml *dichlormethanu R*, pak se zfiltruje. Filtrát se odpaří do sucha při teplotě nepřesahující 40 °C, zbytek se rozpustí v 0,1 ml *toluenu R*.

Porovnávací roztok. 50 mg *methanolu R*, 20 μl *cineolu R*, 10 mg *thymolu R* a 10 μl *menthylacetatu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 10 μl porovnávacího roztoku a 30 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se suší do vymizení pachu rozpouštědel. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku může být slabě zbarvená skvrna odpovídající polohou místu pod skvrnou thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a zahřívá se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou skvrny v pořadí vzestupné hodnoty R_F: v dolní třetině tmavomodrá (menthol), fialovo-modrá až hnědá (cineol), růžová (thymol), modrofialová (methylacetat). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny mentholu (velmi intenzivní) a cineolu (slabě zbarvená) odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. V poloze vymezené skvrnami cineolu a thymolu na chromatogramu porovnávacího roztoku mohou být skvrny: světle růžová (karvon), modrošedá (pulegon), šedozelená (isomenthon). Ve střední části je skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně menthylacetatu, bezprostředně pod ní je zelenomodrá skvrna (menthon), v blízkosti čela chromatogramu je výrazná červenofialová skvrna (uhlovodíky); na chromatogramu mohou být další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3,0 %. Nejvýše 3 % drogy vykazující stopy po napadení *Puccinia menthae* a nejvýše 5 % stonků silnějších 5 mm.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g drogy se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

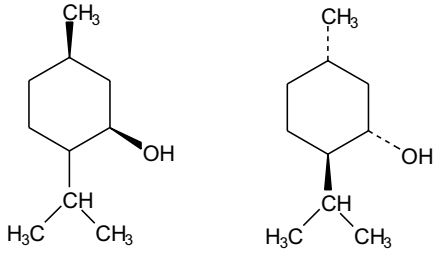
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 20,0 g rozdrcené drogy se destiluje 2 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min v 500ml baňce se 200 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Mentholum racemicum

Racemický menthol



$C_{10}H_{20}O$ M_r 156,27 CAS 15356-70-4

Je to směs stejných dílů (1*R*,3*R*,4*S*)-3-*p*-menthanolu a (1*S*,3*S*,4*R*)-3-*p*-menthanolu.

Vlastnosti

Sypký nebo ve shlucích krystalický prášek nebo hranolovité, popř. jehlicovité bezbarvé lesklé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, v etheru a v etheru petrolejovém, snadno rozpustný v mastných olejích a v tekutém parafinu, velmi těžce rozpustný v glycerolu.

Taje při asi 34 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 25 mg *mentholu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Suší se na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel, postříká se *anisaldehydem RS* a 5 min až 10 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C.

Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je retenčním časem a přibližnými rozměry shodný s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

D. 0,20 g se rozpustí v 0,5 ml *pyridinu bezvodého R*, přidají se 3 ml roztoku *dinitrobenzoylchloridu R* (150 g/l) v *pyridinu bezvodém R* a 10 min se zahřívá na vodní lázni. Po malých dávkách a za stálého míchání se přidá 7,0 ml *vody R* a směs se nechá 30 min ve vodě s ledem; vznikne sraženina. Supernatantní tekutina se slije, sraženina se promyje dvakrát 5 ml ledové *vody*, rekrystalizuje se z 10 ml *acetonu R*, promyje se ledovým *acetonem R* a suší se 30 min při 75 °C při tlaku nepřesahujícím 2,7 kPa. Krystaly tají *(2.2.14)* při 130 °C až 131 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* a zředí se jím na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R*, zředí se jím na 10 ml a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +0,2° až -0,2°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 40,0 mg zkoušené látky a 40,0 mg *isomentholu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,10 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 40,0 mg *mentholu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2,0 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro chromatografii R* impregnovanou 15 % *makrogolu 1500 R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C, teplota nástřikového prostoru je 150 °C a teplota detektoru je 200 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času píku mentholu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) součet ploch píků, kromě hlavního, není větší než 1 % plochy hlavního píku. Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05 % plochy hlavního píku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) rozlišení mezi píky mentholu a isomentholu je nejméně 1,4 a poměr signálu hlavního píku k šumu není menší než 5.

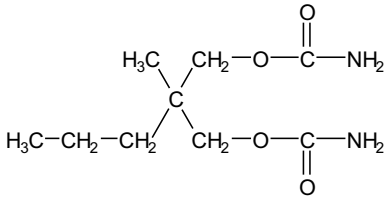
Zbytek po odpaření. 2,00 g zkoušené látky se odpaří na vodní lázni a zahřívá se 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1,0 mg (0,05 %).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, v chladu.

§ Meprobamatum

Meprobamát



$C_9H_{18}N_2O_4$ M_r 218,25 CAS 57-53-4

Je to 2-methyl-2-propyl-1,3-propandiyldikarbamat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{18}N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý amorfní nebo krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v etheru, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 104 °C až 108 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *meprobamátu CRL*.

C. K 0,5 g se přidá 1 ml *acetanhydridu R* a 0,05 ml *kyseliny sírové R*, promíchá se a nechá se 30 min stát za občasného protřepání. Pak se roztok po kapkách přidá k 50 ml *vody R*, promíchá se a nechá stát. Třením stěn zkumavky skleněnou tyčinkou se vyvolá tvorba sraženiny, která po zfiltrování, promytí a vysušení při 60 °C taje *(2.2.14)* při 124 °C až 128 °C.

D. 0,2 g se rozpustí v 15 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l RS* a vaří se 15 min pod zpětným chladičem.

Přidá se 0,5 ml *kyseliny octové ledové R* a 1 ml roztoku *dusičnanu kobaltnatého R* (50 g/l) v *ethanolu R;* vzniká temně modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve 20 ml *ethanolu R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *pyridinu R*, *acetonu R* a *hexanu R* (10 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 30 min při 120 °C a po

ochlazení se postříká roztokem *vanilinu R* (0,25 g) ve vychlazené směsi 10 ml *lihu 96% R* a 40 ml *kyseliny sírové R*. Pak se zahřívá 30 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok (1 μg Pb/ml) se připraví zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí v 15 ml roztoku *kyseliny sírové R* 25% *(V/V)* a 3 h se vaří pod zpětným chladičem. Po vychladnutí se obsah baňky opatrně zředí 30 ml *vody R*, znovu se ochladí a převede se do přístroje na destilaci s vodní párou. Přidá se 40 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a ihned se začne destilovat s vodní párou. Destilát se jímá do 40 ml roztoku *kyseliny borité R* (40 g/l), až celkový objem dosáhne asi 200 ml. Po přidání 0,25 ml *indikátoru směsného BMF RS* se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* ze zeleného do fialového zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,91 mg $C_9H_{18}N_2O_4$.

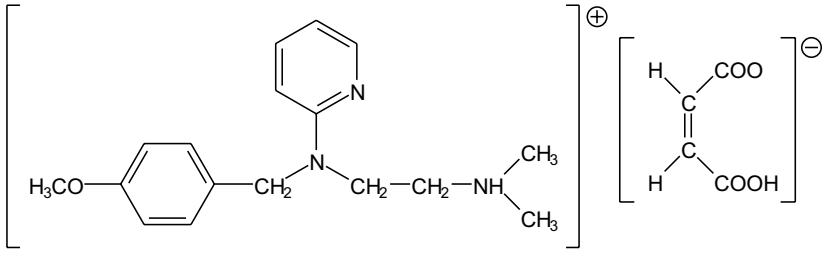
Uchovávání

Psychotropní látka.

† Mepyramini hydrogenomaleas

Mepyraminiumhydrogenmaleinat

Synonymum. Mepyramini maleas



$C_{21}H_{27}N_3O_5$ M_r 401,46 CAS 59-33-6

Je to [N-(2-pyridyl)-4-methoxybenzylaminoethyl]dimethylamoniumhydrogenmaleinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{27}N_3O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 99 °C až 103 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mepyraminiumhydrogenmaleinatu CRL*. Měří se roztoky v *dichlormethanu R* (50 g/l) za použití 0,1mm kyvet.

C. 0,100 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 239 nm a při 316 nm. Specifická absorbance v maximu při 239 nm je 431 až 477 a v maximu při 316 nm je 196 až 220.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je shodná polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

E. 0,1 g se rozetře s 3 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a vytřepe se třikrát 5 ml *etheru R*. K 0,1 ml vodné vrstvy se přidají 3 ml *kyseliny sírové R* obsahující 10 mg *resorcinolu R* a směs se 15 min zahřívá na vodní lázni; nevznikne žádné zbarvení. Ke zbytku vodné vrstvy se přidá 1 ml *bromové vody RS*, 15 min se zahřívá na vodní lázni, pak se zahřeje k varu a ochladí se. K 0,2 ml tohoto roztoku se přidají 3 ml *kyseliny sírové R* obsahující 10 mg *resorcinolu R* a 15 min se zahřívá na vodní lázni; vzniká fialově růžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. 5 ml roztoku S se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 25 ml. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,9 až 5,2; měří se roztok připravený zředěním 1 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,4 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml. Připraví se těsně před použitím.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,4 g *mepyraminiumhydrogenmaleinatu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (d). K 2 ml porovnávacího roztoku (c) se přidají 2 ml *chloroformu R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *ethylacetatu R* (2 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, nevykazuje větší intenzitu zhášení fluorescence než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže R_F hlavních skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a) není menší než 0,2 a skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) je zřetelně viditelná. Skvrna na startu (kyselina maleinová) se nebere v úvahu.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,25 %; 1,000 g se suší v sušárně při 80 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,07 mg $C_{21}H_{27}N_3O_5$.

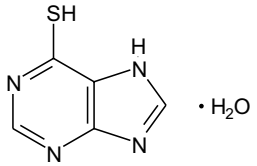
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Mercaptopurinum

Merkaptopurin



$C_5H_4N_4S \cdot H_2O$ M_r 170,19 CAS 6112-76-1

M_r bezvodého 152,17

Je to monohydrát 6-purinthiolu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_4N_4S$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru, těžce rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. 20 mg se rozpustí v 5 ml *dimethylsulfoxidu R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 200 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje pouze jedno absorpční maximum při 325 nm.

B. Asi 20 mg se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* zahřátého na 60 °C a přidá se 1 ml nasyceného roztoku *octanu rtuťnatého R* v *lihu 96% R;* vzniká bílá sraženina.

C. Asi 20 mg se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* zahřátého na 60 °C a přidá se 1 ml roztoku *octanu olovnatého R* (10 g/l) v *lihu 96% R;* vzniká žlutá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hypoxanthin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF $_{254}$R*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v 1 ml *dimethylsulfoxidu R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml. *Porovnávací roztok*. 10 mg *hypoxanthinu R* se rozpustí v 10 ml *dimethylsulfoxidu R* a zředí se *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna odpovídající hypoxanthinu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (2,0 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 10,0 % až 12,0 %; stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 50 ml *dimethylformamidu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,22 mg $C_5H_4N_4S$.

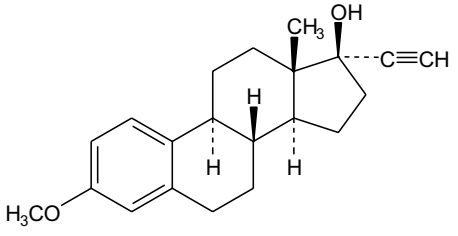
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Mestranolum

Mestranol



$C_{21}H_{26}O_2$ M_r 310,44 CAS 72-33-3

Je to 3-methoxy-19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-17-ol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{26}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etheru, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 150 °C až 154 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mestranolu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou, fluorescencí a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny sírové R;* vzniká červené zbarvení, které v ultrafialovém světle při 365 nm zelenožlutě fluoreskuje. Roztok se přidá k 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení roztoku se změní na růžové a stáním vzniká růžová až fialová sraženina.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -20° až -24°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v *pyridinu bezvodém R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 25,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 260 nm až 310 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 279 nm a 288 nm, a minimum při 286 nm. Specifická absorbance v maximu při 279 nm je 62 až 68 a při 288 nm je 59 až 64.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *mestranolu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel. Pak se deska zahřívá 10 min při 110 °C a ještě horká vrstva se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS*. Deska se znovu zahřívá 10 min při 110 °C a pozoruje se v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a pouze jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 40 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 5 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,04 mg $C_{21}H_{26}O_2$.

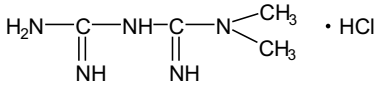
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Metformini hydrochloridum

1998

Metforminiumchlorid



$C_4H_{12}ClN_5$ M_r 165,63 CAS 1115-70-4

Je to 1,1-dimethylbiguanidiumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_{12}ClN_5$.

Vlastnosti

Bílé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 222 °C až 226 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *metforminiumchloridu CRL.* Měří se tablety látek připravené za použití *chloridu draselného R.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 20 mg *metforminiumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *1-butanolu R* a *vody R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C a postříká se směsí stejných objemových dílů roztoku *nitroprussidu sodného R* (100 g/l), roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (100 g/l) a roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l) připravených 20 min před použitím.

Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 5 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidá 0,25 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 0,10 ml *1-naftolu RS*. Promíchá se a nechá se 15 min stát ve vodě s ledem. Přidá se 0,5 ml *bromnanu sodného RS* a promíchá se; vzniká růžové zabarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *kyanoguanidinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *melaminu R* se rozpustí v asi 90 ml *vody R,* přidá se 5,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné nepravidelným porézním silikagelem s chemicky vázanými skupinami kyseliny benzensulfonové (10 μm), nebo nerezové ocelové kolony 0,11 m dlouhé s vnitřním průměrem 4,7 mm naplněné pravidelným porézním silikagelem s chemicky vázanými skupinami kyseliny benzensulfonové (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou je roztok *dihydrogenfosforečnanu amonného R* (17 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,0,
- spektrofotometrického detektoru, 218 nm.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím melaminu a píkem odpovídajícím metforminiumchloridu není menší než 10.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2násobku retenčního času metforminiumchloridu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího kyanoguanidinu není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,02 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího kyanoguanidinu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 5 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Z důvodu předejití přehřátí reakčního prostředí se po celou dobu stanovení důkladně míchá a titrace se zastaví okamžitě po dosažení bodu ekvivalence.

60,0 mg se rozpustí ve 4 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

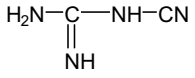
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,28 mg $C_4H_{12}ClN_5$.

Uchovávání

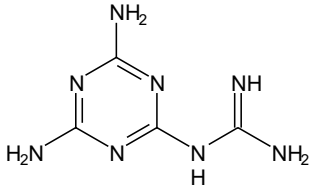
V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

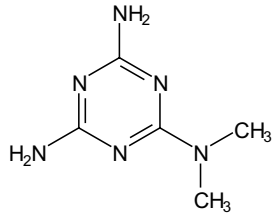
Nečistoty



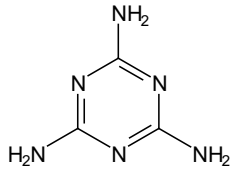
A. kyanguanidin,



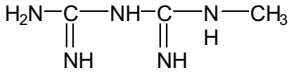
B. 1-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)guanidin,



C. N,N-dimethyl-2,4,6-triamino-1,3,5-triazin,



D. 2,4,6-triamino-1,3,5-triazin (melamin),

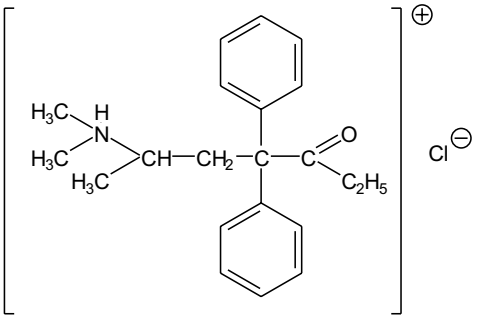


E. 1-methylbiguanid.

§§ Methadoni hydrochloridum

Methadoniumchlorid

Synonymum. Methadonium chloratum



$C_{21}H_{28}ClNO$ M_r 345,91 CAS 1095-90-5

Je to (*RS*)-(4,4-difenyl-3-oxo-6-heptyl)dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{28}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Optická otáčivost *(2.2.7)* roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, měřená ve 2dm trubici je -0,05 ° až +0,05°.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 233 °C až 236 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. methadoniumchloridu.*

D. 2,0 ml roztoku S se smíchá s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a 6 ml *thiokyanatanu amonného RS*. Během několika min se za míchání vytvoří krystalická sraženina, která po vysušení při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 143 °C až 148 °C.

E. K 1 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R* a 1 ml *amoniaku zředěného RS1*. Promíchá se a po 5 min se zfiltruje. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 10 ml roztoku S se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 25 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *lihu 96% R* (10 + 30 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 5 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru do změny fialově modrého zbarvení roztoku na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,59 mg $C_{21}H_{28}ClNO$.

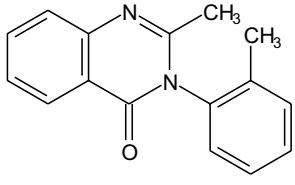
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Omamná látka.

§ Methaqualonum

Methakvalon

Synonymum. Methachalonum



$C_{16}H_{14}N_2O$ M_r 250,30 CAS 72-44-6

Je to (*RS*)-2-methyl-3-(2-methylfenyl)-4(3*H*)-chinazolinon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{14}N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěné kyselině sírové.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 114 °C až 117 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 300 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 235 nm a 270 nm. Specifická absorbance v maximu při 235 nm je 1270 až 1390 a v maximu při 270 nm je 315 až 345.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. methakvalonu*.

D. Asi 10 mg se rozpustí ve 2,0 ml *lihu 96% R*, přidá se 1,0 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS1* a zahřívá se 5 min na vodní lázni; vzniká červeno-oranžové zabarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 0,6 g se protřepává 5 min s 30 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Kyselina 2-aminobenzoová. 1,00 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 50,0 ml (zkoušený roztok). Připraví se porovnávací roztok takto: 40,0 mg *kyseliny 2-aminobenzoové R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí rozpouštědel na 100,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí rozpouštědel na 50,0 ml (porovnávací roztok).

Ke zkoušenému roztoku a porovnávacímu roztoku se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 5 min se chladí ve vodě s ledem. Přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS,* znovu se 5 min chladí ve vodě s ledem, přidá se 1,5 ml čerstvě připraveného roztoku *kyseliny amidosírové R* (10 g/l) a protřepává se, dokud se roztok neodbarví. Potom se přidá 2,5 ml čerstvě připraveného roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (2 g/l) a nechá se stát 2 h 30 min. Hodnotí se zbarvení roztoků postupem uvedeným ve stati *(2.2.2, Metoda II)*. Zkoušený roztok není zabarven intenzivněji než porovnávací roztok (20 μg/g).

***o*-Toluidin.** 0,50 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10,0 ml (zkoušený roztok). Připraví se porovnávací roztok takto: 50 mg čerstvě předestilovaného *o-toluidinu R* se rozpustí v 5,0 ml *acetonu R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 100,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10,0 ml (porovnávací roztok).

Ke zkoušenému roztoku a porovnávacímu roztoku se přidá 5 ml *vody R* a chladí se 5 min ve vodě s ledem. Přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS*, znovu se 5 min chladí ve vodě s ledem a přidá se 10 ml čerstvě připraveného roztoku *2-naftolu R* (2 g/l) v *hydroxidu sodném zředěném RS*. Hodnotí se zbarvení roztoků postupem uvedeným ve stati *(2.2.2, Metoda II)*. Zkoušený roztok není zabarven intenzivněji než porovnávací roztok (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 30,0 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,03 mg $C_{16}H_{14}N_2O$.

Uchovávání

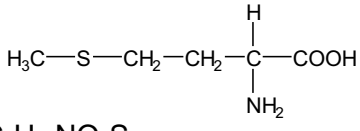
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Psychotropní látka.

Methioninum

Methionin

Synonymum. L-Methioninum



$C_5H_{11}NO_2S$ M_r 149,21 CAS 63-68-3

Je to kyselina (*S*)-2-amino-4-(methylthio)máselná. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_{11}NO_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *methioninu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 0,1 g zkoušené látky a 0,1 g *glycinu R* se rozpustí ve 4,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidá se 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (25 g/l) a zahřívá se 10 min při 40 °C. Po ochlazení se přidají 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *kyseliny chlorovodíkové R* (1 + 9); vzniká tmavě červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 6,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +22,5° až +24,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g ve 12 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 50,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *methioninu CRL* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) a zředí se stejným roztokem na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *methioninu CRL* a 10 mg *serinu CRL* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) a zředí se stejným roztokem na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Chloridy. K 10 ml roztoku S se přidá 25 ml *vody R,* 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a roztok se nechá 5 min stát chráněn před světlem. Opalescence tohoto roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)* (200 μg/g). Zkumavky se pozorují proti černému pozadí.

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 0,1 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (200 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 0,2 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,125 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,92 mg $C_5H_{11}NO_2S$.

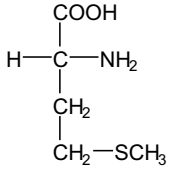
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Methioninum racemicum

Racemický methionin

Synonymum. DL-Methioninum



$C_5H_{11}NO_2S$ M_r 149,21 CAS 59-51-8

Je to kyselina (*RS*)-2-amino-4-(methylthio)máselná. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_{11}NO_2S$.

Vlastnosti

Téměř bílý krystalický prášek nebo malé vločky. Je mírně rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných kyselinách a zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 270 °C (okamžitá metoda).

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *DL-methioninu CRL*. Látky se suší při 105 °C.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Optická otáčivost *(2.2.7)* je -0,05° až +0,05°. Měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředěním stejnou kyselinou na 50,0 ml.

D. Asi 0,1 g zkoušené látky a 0,1 g *glycinu R* se rozpustí ve 4,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidá se 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (25 g/l) a zahřívá se 10 min při 40 °C. Po ochlazení se přidají 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny fosforečné R* a *kyseliny chlorovodíkové R* (1 + 9); vzniká tmavě červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,4 až 6,1; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.

Porovnávcí roztok (a). 20 mg *DL-methioninu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1- butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se roztokem *ninhydrinu RS*. Pak se deska zahřívá 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Chloridy. 0,25 g se rozpustí v 35 ml *vody R,* přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a roztok se nechá 5 min stát chráněn před světlem. Opalescence tohoto roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)* a 25 ml *vody R* (200 μg/g). Zkumavky se pozorují proti černému pozadí.

Sírany *(2.4.13)*. 1,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody destilované R*, zahřeje se na 60 °C, ochladí se na 10 °C a zfiltruje se. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,140 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové ledové R* a ihned po rozpuštění se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

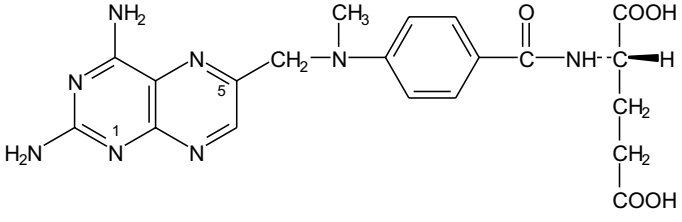
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,92 mg $C_5H_{11}NO_2S$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

† Methotrexatum

Methotrexat



$C_{20}H_{22}N_8O_5$ M_r 454,44 CAS 59-05-2

Je to kyselina (*S*)-N-{4-[2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)methylamino]benzoyl}-2-aminopentandiová. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{22}N_8O_5$.

Vlastnosti

Žlutý nebo oranžový krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96%, v etheru a v dichlorethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích minerálních kyselin a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. 10 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 230 nm až 380 nm. Roztok vykazuje tři absorpční maxima; při 258 nm, 303 nm a 371 nm. Poměr absorbance v maximu při 303 nm k absorbanci v maximu při 371 nm je 2,8 až 3,3.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methotrexatu CRL*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +19° až +24°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v roztoku *uhličitanu sodného R* (14 g/l) a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 12,0 %, stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 250,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *methotrexatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 250,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 25,0 mg zkoušené látky a 25,0 mg *kyseliny listové CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 250,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) v *acetonitrilu R*,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů acetonitrilu R a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,0 (1)* (8 + 92). Průtoková rychlost je 1,4 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 303 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se šestkrát 20 µl porovnávacího roztoku (b). Nastříkne se jednou 20 µl porovnávacího roztoku (a) a na chromatogramu se porovná umístění píku odpovídajícího methotrexatu s umístěním na chromatogramech porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píkem kyseliny listové a píkem methotrexatu není menší než 5,0 a jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku methotrexatu není větší než 2,0 %. Je-li třeba, upraví se pracovní podmínky tak, aby bylo dosaženo předepsaných kritérií.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a).

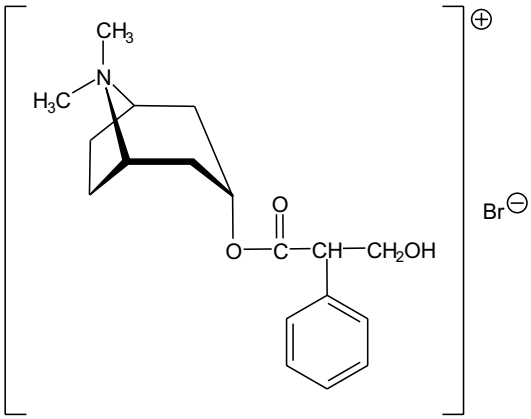
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

†† Methylatropini bromidum

Methylatropiniumbromid

Synonymum. Atropini methobromidum



$C_{18}H_{26}BrNO_3$ M_r 384,31 CAS 2870-71-5

Je to 8-methyl-3α-(*RS*)-tropoyloxy-1α*H*,5α*H*-tropaniumbromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{26}BrNO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 219 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylatropiniumbromidu CRL.*

C. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* nevznikne žádná sraženina.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *acetonu R* a přidá se 0,1 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R;* vzniká fialové zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_9 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,25° až +0,05°; měří se roztok v 2dm trubici připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (10 + 15 + 15 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C do vymizení pachu rozpouštědel, nechá se ochladit a stříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS* do objevení skvrn. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Apomethylatropin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximech při 252 nm a 257 nm. Poměr absorbance v maximu při 257 nm k absorbanci v maximu při 252 nm není menší než 1,19.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 5 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 38,43 mg $C_{18}H_{26}BrNO_3$.

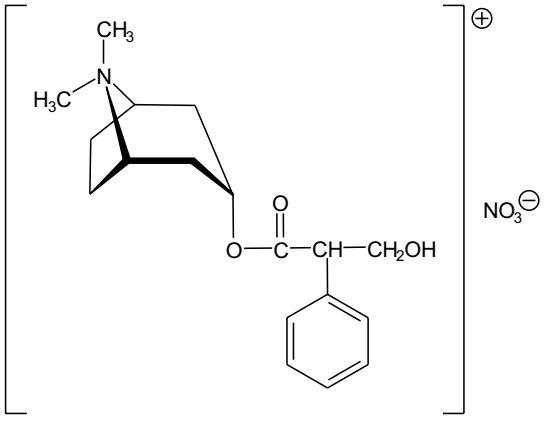
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

†† Methylatropini nitras

Methylatropiniumnitrat

Synonymum. Atropini methonitras



$C_{18}H_{26}N_2O_6$ M_r 366,41 CAS 52-88-0

Je to 8-methyl-3α-(*RS*)-tropoyloxy-1α*H*,5α*H*-tropaniumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{26}N_2O_6$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 167 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.

Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylatropiniumnitratu CRL.*

C. 2,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se smíchá s 2,5 ml *vody R* a přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* nevznikne žádná sraženina.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *acetonu R* a přidá se 0,25 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R;* vzniká fialové zbarvení.

E. K 0,05 ml *difenylaminu RS* se přidá 0,05 ml roztoku S zředěného 1 : 10; vznikne intenzivní modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_9 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,25° až +0,05°; měří se roztok v 2dm trubici připravený rozpuštěním 2,50 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (10 + 15 + 15 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C do vymizení pachu rozpouštědel. Nechá se vychladnout a stříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS* do objevení skvrn. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Apomethylatropin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximech při 252 nm a 257 nm. Poměr absorbance při 257 nm k absorbanci při 252 nm není menší než 1,17.

Halogenidy *(2.4.4)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,5 ml základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*.

Stříbro. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *sulfidu sodného RS* a nechá se 2 min stát. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_8 *(2.2.2, Metoda II)* (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,64 mg $C_{18}H_{26}N_2O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

Methylcellulosum

Methylcelulosa

CAS 9004-67-5

Je to částečně O-methylovaná celulosa.

Vlastnosti

Bílý, nažloutle bílý nebo šedobílý prášek nebo zrnka. Ve vysušeném stavu je hygroskopická, prakticky nerozpustná v horké vodě, v acetonu, v ethanolu, v etheru a v toluenu. Rozpouští se ve studené vodě za vzniku koloidního roztoku.

Zkoušky totožnosti

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zahřeje za občasného promíchávání ve vodní lázni. Při teplotě nad 50 °C vzniká zákal nebo vločkovitá sraženina. Po ochlazení je roztok opět čirý.

B. K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml roztoku *taninu R* (100 g/l); vznikne nažloutle bílá vločkovitá sraženina, která se rozpouští v *amoniaku zředěném RS1*.

C. 1 g se ve zkumavce asi 160 mm dlouhé pečlivě smíchá se 2 g jemně upráškovaného *síranu manganatého R*. Do horní části zkumavky 2 cm hluboko se vloží proužek filtračního papíru, který je napuštěn čerstvě připravenou směsí objemových dílů roztoku *diethanolaminu R* 20% *(V/V)* a roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) (1 + 11), jejíž pH bylo upraveno *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na hodnotu asi 9,8. Zkumavka se ponoří 8 cm hluboko do lázně se silikonovým olejem vyhřáté na 190 °C až 200 °C; proužek filtračního papíru se během 10 min nezbarví modře. Současně se provede slepá zkouška.

D. 0,2 g se bez zahřátí úplně rozpustí v 15 ml roztoku *kyseliny sírové R* 70%. Roztok se za promíchávání vleje do 100 ml ledové *vody R* a zředí se jí na 250 ml. K 1 ml tohoto roztoku se ve zkumavce za opatrného promíchávání a chlazení ve vodě s ledem přidá po kapkách 8 ml *kyseliny sírové R*. Poté se roztok zahřívá přesně 3 min ve vodní lázni a ihned se ochladí ve vodě s ledem. K ochlazené směsi se opatrně přidá 0,6 ml *ninhydrinu RS2*, dobře se promíchá a nechá se stát při 25 °C; ihned vznikne růžové zbarvení, které se během 100 min nezmění na fialové.

E. 1 ml roztoku S se naleje na skleněnou desku. Po odpaření vody vznikne tenký film.

F. 0,2 g se nerozpustí v 10 ml *toluenu R* ani v 10 ml *ethanolu R*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství odpovídající 1,0 g vysušené látky se za promíchávání vnese do 50 g *vody prosté oxidu uhličitého R* zahřáté na 90 °C. Po ochlazení se upraví hmotnost roztoku *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 g a míchá se do úplného rozpuštění. Před provedením zkoušky Vzhled roztoku se roztok nechá stát 1 h při 2 °C až 8 °C.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 8,0; měří se roztok S.

Zdánlivá viskozita. 75 % až 140 % deklarované hodnoty. Množství odpovídající 6,00 g vysušené zkoušené látky se za promíchávání vnese do 150 g *vody R* zahřáté na 90 °C. 10 min se míchá vrtulovou míchačkou, potom se vloží na 40 min do lázně obsahující vodu s ledem a promíchává se do úplného rozpuštění. Hmotnost roztoku se upraví na 300 g a odstřeďuje se do odstranění vzduchu. Roztok se vytemperuje na (20 ± 1) °C a stanoví se viskozita *(2.2.10)* pomocí rotačního viskozimetru při 20 °C a smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Chloridy *(2.4.4)*. 1 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

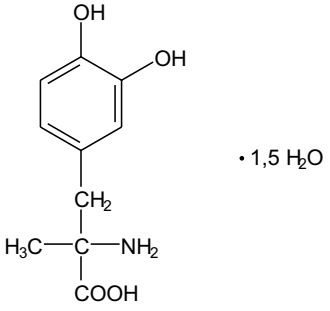
V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede zdánlivá viskozita 2% roztoku v mPa.s.

† Methyldopum

Methyldopa



$C_{10}H_{13}NO_4$. 1,5 H_2O $_r$ 238,24 CAS 41372-08-1

$_r$ bezvodé 211,22

Je to seskvihydrát kyseliny (*S*)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-methylpropionové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{13}NO_4$.

Vlastnosti

Bílý až žlutobílý krystalický prášek nebo bezbarvé až téměř bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru, snadno rozpustná ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methyldopy CRL.*

B. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *chloridu železitého RS2;* vzniká zelené zbarvení, které se přidáním 0,1 g *methenaminu R* změní na modrofialové.

C. Asi 5 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 5 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *dusitanu sodného RS* obsahujícího *molybdenan amonný R* (100 g/l); vznikne žluté zbarvení, které se přidáním *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* změní na hnědočervené.

D. K asi 5 mg se přidá 1 ml *vody R*, 1 ml *pyridinu R* a 5 mg *nitrobenzoylchloridu R* a zahřeje se k varu. Za třepání se přidá 0,2 ml *uhličitanu sodného RS;* vznikne oranžové nebo oranžově hnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ nebo H_6 *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele reagující látky. 1,0 g se rozpustí zahříváním ve 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS.* Na změnu zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Optická otáčivost *(2.2.7).* -1,10° až -1,23°; měří se následující roztok: množství odpovídající 2,20 g bezvodé zkoušené látky se rozpustí v *chloridu hlinitém RS* a zředí se jím na 50,0 ml.

Absorbance *(2.2.25).* 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje maximum při 280 nm. Specifická absorbance v maximu je 122 až 137, počítáno na bezvodou látku.

Methoxymethyldopa a příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí ve směsi 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1* a 9,6 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (a). 5 mg *3-methoxymethyldopy CRL* se rozpustí ve 100 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se smíchá s 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se odděleně nanese 10 μl zkoušeného roztoku, 10 μl porovnávacího roztoku (a) a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (15 + 25 + 65) po dráze 10 cm. Vrstva se ihned vysuší v proudu teplého vzduchu a postříká se směsí 5 objemových dílů roztoku *dusitanu sodného R* (50 g/l) a 45 objemových dílů roztoku *nitroanilinu R* (3 g/l) ve směsi 20 objemových dílů *vody R* a 80 objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R.* Vrstva se rychle usuší v proudu teplého vzduchu, postříká se roztokem

uhličitanu sodného R (200 g/l) a ihned se pozoruje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 g/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 10,0 % až 13,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve směsi 15 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 30 ml *dioxanu R*. Přidá se 0,1 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,12 mg $C_{10}H_{13}NO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Methyleni chloridum

Dichlormethan

CH_2Cl_2 M_r 84,93 CAS 75-09-2

Může obsahovat nejvýše 2,0 % (*V/V*) ethanolu nebo nejvýše 0,03 % (*V/V*) amylenu jako stabilizátoru.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá těkavá kapalina. Je mírně rozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Ethanol, amylen a jiné příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje velikostí a retenčním časem s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 2 ml se zahřívají 30 min s 2 g *hydroxidu draselného R* a 20 ml *lihu 96% R* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 15 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a roztok se zfiltruje. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (15 g/l), 2 ml *vody R* a 8 ml *kyseliny sírové R;* vznikne fialové zbarvení.

E. 2 ml filtrátu získaného ve zkoušce D vyhovují zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Je to čirá *(2.2.1)* a bezbarvá *(2.2.2, Metoda II)* kapalina.

Kysele reagující látky. K 50 ml *methanolu R* předem zneutralizovaného za použití 0,1 ml *modře bromthymolové RS1* se přidá 50 g zkoušené látky. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Relativní hustota *(2.2.5).* 1,320 až 1,332.

Index lomu *(2.2.6).* 1,423 až 1,425.

Ethanol, amylen a jiné příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok (a). Zkoušená látka.
Zkoušený roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml *dichlormethanu CRL* se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). K 20,0 ml *ethanolu R* se přidá 0,3 ml *amylenu R* a zředí se zkoušeným roztokem (a) na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí zkoušeným roztokem (a) na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,1 ml *methanolu R* a 0,1 ml *dichlormethanu CRL* se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (136 µm až 173 µm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 90 °C až do nástřiku a potom se zvyšuje rychlostí 4 °C/min až na teplotu 190 °C, při které se udržuje 15 min; teplota vstřikovacího prostoru a detektoru se udržuje na 240 °C.

Nastříkne se 1 µl porovnávacího roztoku (d). Jestliže se použije zapisovač, nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku methanolu nebyla menší než 25 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) rozlišení mezi píky odpovídajícími methanolu a dichlormethanu není menší než 3,0.

Nastříknou se dvakrát 2 µl porovnávacího roztoku (c). Jestliže získané píky mají rozdíl ploch větší než 1,0 %, ověří se reprodukovatelnost ze čtyř oddělených nástřiků porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku není větší než 5,0 %.

Nastříknou se 2 µl zkoušeného roztoku (a), 2 µl porovnávacího roztoku (b) a 2 µl porovnávacího roztoku (c). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plochy píků odpovídajících ethanolu a případně amylenu nejsou větší než rozdíl ploch píků odpovídajících píkům ethanolu a amylenu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) a chromatogramu zkoušeného roztoku (a) (2,0 %, případně 0,03 %).

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píků ethanolu a amylenu, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Volný chlor. Do zkumavky se zabroušenou zátkou se přenese 5 ml, přidá se 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a 0,2 g *škrobu rozpustného R*. 30 s se třepe a nechá se 5 min stát; nevzniká modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 25,0 g se odpaří do sucha na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a znovu se odpaří. Odparek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (1 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 10 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Zbytek po odpaření. 50,0 g se odpaří do sucha na vodní lázni a 30 min se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 1 mg (20 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,05 %; stanoví se s 10,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede název a koncentrace použitých stabilizátorů.

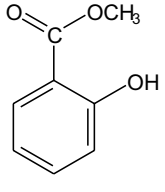
Nečistoty

A. tetrachlormethan,
B. trichlormethan (chloroform),
C. ethanol,
D. methanol,
E. 2-methyl-2-buten (amylen).

Methylis salicylas

Methylsalicylat

Synonymum. Methylum salicylicum



$C_8H_8O_3$ M_r 152,15 CAS 119-36-8

Je to methylester kyseliny 2-hydroxybenzoové. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_8H_8O_3$.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mísitelný s lihem, s tuky a se silicemi.

Zkoušky totožnosti

A. 0,25 ml se zahřívá 5 min s 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* na vodní lázni. Přidají se 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Vzniklá sraženina se zfiltruje, promyje *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C; teplota tání *(2.2.14)* sraženiny je 156 °C až 161 °C.

B. K 10 ml nasyceného roztoku se přidá 0,05 ml *chloridu železitého RS1;* vzniká fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Ke 2 ml se přidá 10 ml *lihu 96% R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. 5,0 g se rozpustí ve směsi 50 ml *lihu 96% R* a 0,2 ml *zeleně bromkresolové RS* předem zneutralizované do modrého zbarvení *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. Do znovuobjevení se modrého zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Index lomu *(2.2.6).* 1,535 až 1,538.

Relativní hustota *(2.2.5).* 1,180 až 1,186.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 25 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,05 ml *červeně fenolové RS* a roztok se neutralizuje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. Ke zneutralizovanému roztoku se přidá 50,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem na vodní lázni. Po ochlazení se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS*. Vypočítá se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* použitého ke zmýdelnění. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,21 mg sloučeniny $C_8H_8O_3$.

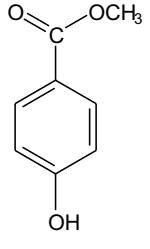
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Methylparabenum

Methylparaben

Synonymum. Methylis parahydroxybenzoas



$C_8H_8O_3$ M_r 152,15 CAS 99-76-3

Je to methyl-4-hydroxybenzoat. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_8H_8O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 125 °C až 128 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylparabenu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. K asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS*, 30 s se vaří a ochladí se (roztok a). K dalším asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS;* látka se částečně rozpustí (roztok b). K roztokům (a) a (b) se současně přidá 5 ml *aminopyrazolonu RS* a 1 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS* a promíchá se; roztok (b) je žlutý až oranžově hnědý; roztok (a) je oranžový až červený a jeho zbarvení je zřetelně intenzivnější než zbarvení roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidají 3 ml *lihu 96% R*, 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *methylparabenu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *ethylparabenu CRL* se rozpustí v 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, vody R* a *methanolu R* (1 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nepřevyšuje žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se odváží do baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 40,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zpětný chladič propláchne 5 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá do baňky. Nadbytek hydroxidu sodného se titruje *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* do druhé inflexe. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 152,1 mg $C_8H_8O_3$.

Uchovávání

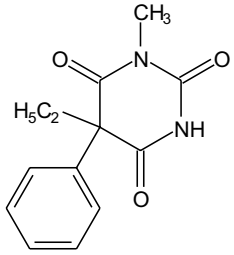
V dobře uzavřených obalech.

Nečistoty

A. kyselina 4-hydroxybenzoová,
B. ethyl-4-hydroxybenzoat (ethylparaben),
C. propyl-4-hydroxybenzoat (propylparaben),
D. butyl-4-hydroxybenzoat (butylparaben).

§ Methylphenobarbitalum

Methylfenobarbital



$C_{13}H_{14}N_2O_3$ M_r 246,27 CAS 115-38-8

Je to kyselina (*RS*)-5-ethyl-1-methyl-5-fenylbarbiturová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{13}H_{14}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v etheru, velmi těžce rozpustný v ethanolu. S alkalickými hydroxidy, s uhličitany a s amoniakem tvoří ve vodě rozpustné soli.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Stanoví se teplota tání *(2.2.14)* zkoušené látky. Smíchají se stejné díly zkoušené látky a *methylfenobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Stanovené teploty tání, které jsou asi 178 °C, se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylfenobarbitalu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *methylfenobarbitalu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K asi 10 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R* a 0,1 ml *kyseliny dusičné R* a směs se zahřívá 10 min na vodní lázni. Po ochlazení ve vodě s ledem se přidá 5 ml *vody R*, 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 5 ml *acetonu R*, protřepe se a nechá se stát; vzniká tmavě červené zbarvení horní vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se za mírného zahřátí rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 6 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 1,0 g se vaří 2 min s 50 ml *vody R*, nechá se ochladit a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžově žlutý. Ke změně zbarvení roztoku na čistě žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *fenobarbitalu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a potom se postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R*. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem 96% prostým aldehydů R* (1 : 5), 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a ihned se hodnotí. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku v ultrafialovém světle při 254 nm a po postřiku detekčním činidlem, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 5 ml *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do vzniku čistě modrého zbarvení roztoku. Současně se provede slepá zkouška.

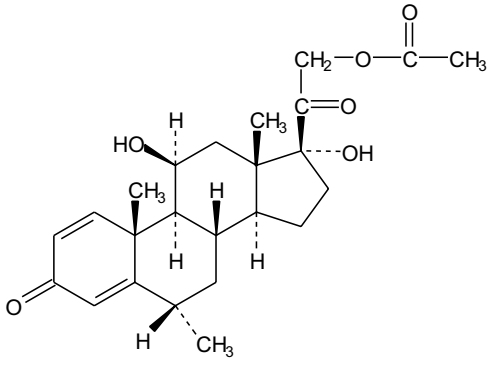
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,63 mg $C_{13}H_{14}N_2O_3$.

Uchovávání

Psychotropní látka.

† Methylprednisoloni acetas

Methylprednisolonacetat



$C_{24}H_{32}O_6$ M_r 416,51 CAS 53-36-1

Je to 11β,17,21-trihydroxy-6α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{24}H_{32}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu a v lihu 96 %, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylprednisolonacetatu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *acetonu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *methylprednisolonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *prednisolonacetatu CRL* a 10 mg *methylprednisolonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *1-butanolu R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm jsou patrny dvě skvrny, které nemusí být zcela odděleny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zabroušené zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se probublává proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 1 h při 45 °C za ochrany před světlem a pak se nechá vychladnout.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *methylprednisolonacetatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zábrusové zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se probublává proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 1 h při 45 °C za ochrany před světlem a ochladí se.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušných porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hod-

notu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červené zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok červenohnědě fluoreskuje. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok zelenožlutě fluoreskuje.

E. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +97° až +105°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v 5 ml *tetrahydrofuranu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 4 mg *methylprednisolonacetatu CRL* a 4 mg *dexamethasonacetatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která se připraví takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 260 ml *tetrahydrofuranu R* a 700 ml *vody R* a nechá se ustát. Potom se doplní *vodou R* na 1000 ml a opět se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a).

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: methylprednisolonacetatu asi 43 min a dexamethasonacetatu asi 57 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími methylprednisolonacetatu a dexamethasonacetatu je nejméně 6,5. V případě potřeby se upraví koncentrace *vody R* v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 243 nm.

Vypočítá se obsah $C_{24}H_{32}O_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 355.

Uchovávání

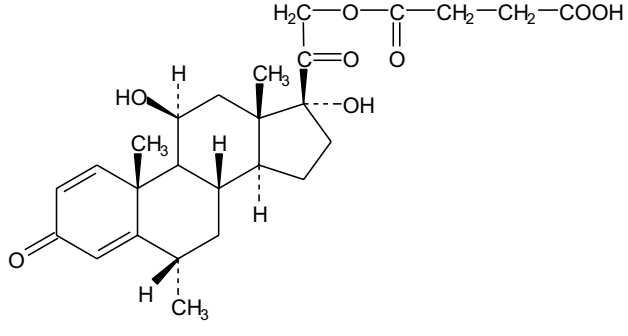
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 20(α+β)-dihydro-methylprednisolon-21-acetat,
B. 6α-methylprednisolon,
C. 21-dehydromethylprednisolon,
D. 21-dehydro-17-deoxymethylprednisolon,
E. prednisolon-acetat,
F. 6α-methyl-1,4-pregnadien-3,11,20-trion-21-yl-acetat,
G. 6α-methylhydroxykortison-acetat,
H. 11β-hydroxy-6α-methyl-1,4,17(20)-pregnatrien-3-on-21-yl-acetat.

† Methylprednisoloni hydrogenosuccinas

Methylprednisolonhydrogensukcinat



$C_{26}H_{34}O_8$ M_r 474,55 CAS 2921-57-5

Je to 11β,17,21-trihydroxy-6α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-hydrogenbutandioat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{26}H_{34}O_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru, těžce rozpustný v acetonu a v ethanolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylprednisolonhydrogensukcinatu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *methylprednisolonhydrogensukcinatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *hydrokortisonhydrogensukcinatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *kyseliny mravenčí R*, *ethanolu R* a *dichlormethanu R* (0,1 + 1 + 15), po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě skvrny, které však nemusí být zcela rozděleny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zabroušené zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (0,8 g/l) v *methanolu R* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 30 min při 45 °C za ochrany před světlem a pak se nechá vychladnout.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *methylprednisolonhydrogensukcinatu CRL* se rozpustí za mírného zahřátí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zabroušené zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydroxidu draselného R* (0,8 g/l) v *methanolu R* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 30 min při 45 °C za ochrany před světlem a ochladí se.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušných porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roz-

toků se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně vyšší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červenohnědé zbarvení. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a tvoří se sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,100 g se rozpustí v 5 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS;* roztok je čirý (*2.2.1*).

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +87° až +95°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *methylprednisolonhydrogensukcinatu pro zkoušku způsobilosti CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny octové ledové R* 3% (*V/V*) (33 + 67),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: methylprednisolonhydrogensukcinatu asi 22 min a methylhydrokortison-21-hydrogensukcinatu (nečistoty, k jejíž eluci dochází těsně po hlavní složce a vytvářející na hlavním píku prodlevu) asi 24 min. Změří se výška (A) píku methylhydrokortison-21-hydrogensukcinatu nad základní linií a výška (B) nad základní linií nejnižšího bodu křivky oddělujícího tento pík od píku methylprednisolonhydrogensukcinatu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže hodnota A je větší než čtyřnásobek hodnoty B. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 243 nm.

Vypočítá se obsah $C_{26}H_{34}O_8$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 320.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

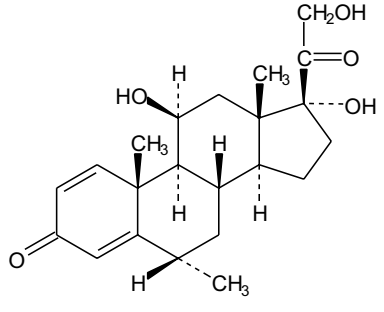
Separandum.

Nečistoty

A. methylprednisolon,
B. methylprednisolon-17-hydrogensukcinat,
C. methylprednisolonacetat,
D. methylhydrokortison-21-hydrogensukcinat.

† Methylprednisolonum

Methylprednisolon



$C_{22}H_{30}O_5$ M_r 374,48 CAS 83-43-2

Je to 11β,17,21-trihydroxy-6α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{22}H_{30}O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v acetonu a v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methylprednisolonu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *acetonu R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *methylprednisolonu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *hydrokortisonu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) smíchaná se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77), po dráze 15 cm. Provede se druhé vyvíjení směsí objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převede do skleněné zabroušené zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se pod proudem *dusíku R* odpaří za opatrného zahřívání. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*) a 50 mg *bismutičnanu sodného R*. Zkumavka se uzavře a suspenze se mechanicky třepe 1 h za ochrany před světlem. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*), směs se zfiltruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R*. Čirý filtrát se protřepe s 10 ml *dichlormethanu R*. Organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R*.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *methylprednisolonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převede do skleněné zabroušené zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se pod proudem *dusíku R* odpaří za

opatrného zahřívání. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*) a 50 mg *bismutičnanu sodného R*. Zkumavka se uzavře a suspenze se mechanicky třepe 1 h za ochrany před světlem. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*), směs se zfiltruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R*. Čirý filtrát se protřepe s 10 ml *dichlormethanu R*. Organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R*.

Na vrstvu se odděleně nanese 5 μl zkoušeného roztoku (a), 5 μl porovnávacího roztoku (a), 10 μl zkoušeného roztoku (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (b) nanesených ve dvou dávkách, aby se získaly malé skvrny, a vyvíjí se směsí objemových dílů *butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušných porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 15 min se zahřívá při 120 °C. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně vyšší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červené zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok hnědavočerveně fluoreskuje. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok žlutozeleně fluoreskuje.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +79,0° až +86,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 2 mg *methylprednisolonu CRL* a 2 mg *bethamethasonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází A na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- ocelové nerezové kolony 0,25 m dlouhé a o vnitřním průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min s lineárním gradientovým programem za použití následujících podmínek:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0	100	0	izokraticky
15	100	0	počátek lineárního gradientu
40	0	100	konec chromatogramu, návrat na 100A
41	100	0	počátek ustalování s A
46 = 0	100	0	konec ustalování, počátek dalšího chromatogramu

- *mobilní fáze A* - v odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 250 ml *acetonitrilu R* se 700 ml *vody R*, nechá se ustálit, doplní se *vodou R* na 1000 ml a opět se promíchá,
- *mobilní fáze B* - *acetonitril R*,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje při 45 °C. Kolona se ustaluje s mobilní fází B při průtokové rychlosti 2,5 ml/min po dobu nejméně 30 min a potom s mobilní fází A po dobu 5 min. Pro následující chromatogramy se použijí podmínky popsané mezi 40. min až 46. min.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu při nastříknutí 20 μl porovnávacího roztoku (b) činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a při zaznamenání chromatogramu za výše popsaných podmínek jsou retenční časy látek: methylprednisolonu asi 11,5 min a betamethasonu asi 12,5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky methylprednisolonu a betamethasonu není menší než 2,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi A.

Nastříkne se odděleně po 20 μl směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *methanolu R* jako slepá zkouška, 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %). K píkům ze slepé zkoušky a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b), se nepřihlíží.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 243 nm.

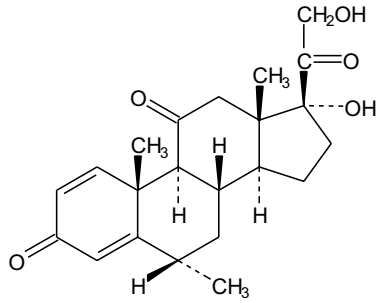
Vypočítá se obsah $C_{22}H_{30}O_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 395.

Uchovávání

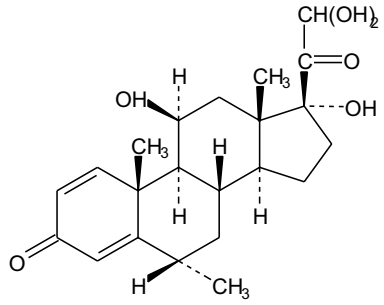
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

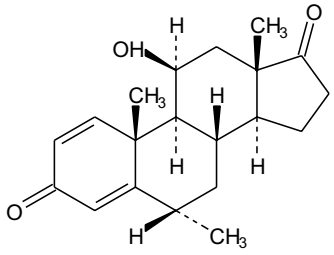
Nečistoty



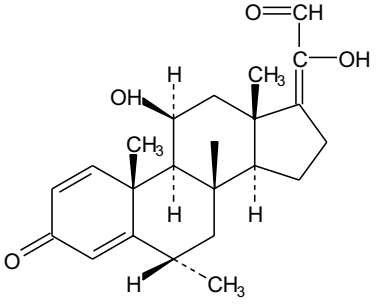
A. 17α,21-dihydroxy-6α-methyl-1,4-pregnadien-3,11,20-trion,



B. 11β,17α,21,21-tetrahydroxy-6α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion,



C. 11β-hydroxy-6α-methyl-1,4-androstadien-3,17-dion,



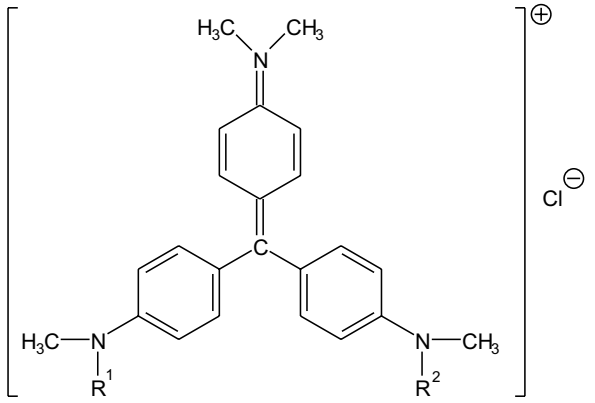
D. *(E)- a (Z)*-11β,20-dihydroxy-6α-methyl-1,4,17(20)-pregnatrien-3,21-dion.

Methylrosanilinii chloridum

N

Methylrosaniliniumchlorid

Synonyma. Methylrosanilinium chloratum, methylvioleť, genciánová violeť (Colour Index: 42 555)



CAS 548-62-9

Je to převážně N,N,N′,N′,N′′,N′′-hexamethyl-4-rosaniliniumchlorid ($R^1 = R^2 = CH_3$; $C_{25}H_{30}ClN_3$; M_r 407,99) s menším množstvím pentamethyl-4-rosaniliniumchloridu ($R^1 = CH_3$; $R^2 = H$; $C_{24}H_{28}ClN_3$; M_r 393,96) a tetramethylrosaniliniumchloridu ($R^1 = R^2 = H$; $C_{23}H_{26}ClN_3$; M_r 379,93).

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 90,0 %, vyjádřeno jako $C_{25}H_{30}ClN_3$.

Vlastnosti

Tmavě zelený krystalický prášek kovového lesku. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v glycerolu.

Zkoušky totožnosti

A. 2,5 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 400 nm až 600 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 590 nm a prodlevu při 552 nm.

B. Asi 20 mg se rozpustí ve 20 ml *vody R;* roztok je tmavě fialový. K roztoku se přidá 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS;* roztok se zbarví modře. Přidá-li se dalších 5 až 7 kapek *kyseliny chlorovodíkové RS*, zbarví se roztok zeleně a dalšími 10 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* žlutohnědě. Zřeďuje-li se tento roztok *vodou R*, mění se jeho zbarvení postupně zase až do fialova.

C. Asi 0,1 g se smísí v porcelánovém kelímku s 0,30 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a 0,30 g *dusičnanu draselného R.* Směs se opatrně zahřívá a potom se ještě asi 10 min žíhá. Bezbarvá tavenina se po vychladnutí rozpustí v 5,0 ml *kyseliny dusičné zředěné R* a tekutina se zfiltruje. K čirému filtrátu se přidá *dusičnan stříbrný RS2;* vylučuje se bílá klkatá sraženina, snadno rozpustná v *amoniaku zředěném RS1*, nerozpustná v *kyselině dusičné R.*

Zkoušky na čistotu

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,200 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Látky nerozpustné v lihu. K 0,500 g v baňce se zábrusem se přidá 50 ml *lihu 96% R* a 15 min se vaří pod zpětným chladičem. Tekutina se ještě za horka zfiltruje předem zváženým filtrem ze slinutého skla (S 4) a baňka i filtr se promývají horkou *vodou R* tak dlouho, až odtékající filtrát je bezbarvý. Zbytek na filtru sušený 1 h při 105 °C váží nejvýše 5 mg (1,0 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Asi 0,3000 g vysušené, jemně rozetřené látky ze zkoušky Ztráta sušením se rozpustí v 50 ml *acetanhydridu R*, přidá se 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 40,80 g $C_{25}H_{30}ClN_3$.

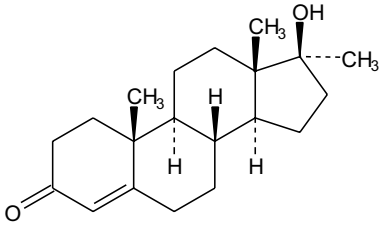
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

† Methyltestosteronum

Methyltestosteron



$C_{20}H_{30}O_2$ M_r 302,46 CAS 58-18-4

Je to 17β-hydroxy-17α-methyl-4-androsten-3-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{20}H_{30}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 162 °C až 168 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *methyltestosteronu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v denním světle ihned po postříkání vrstvy nasyceným roztokem *dichromanu draselného R* ve směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (30 + 70). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +79° až +85°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *lihu 96% R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *methyltestosteronu CRL* se rozpustí v 1 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9).
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *testosteronu CRL* se rozpustí v 0,5 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *etheru petrolejového R* a *butylacetatu R* (1 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 0,500 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Dále se zředí 10,0 ml tohoto roztoku *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241 nm.

Vypočítá se obsah $C_{20}H_{30}O_2$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 540.

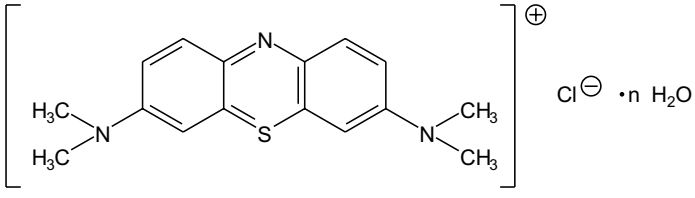
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Methylthioninii chloridum ad usum externum

Methylthioniniumchlorid k vnějšímu použití

Synonyma. Methylthioninium chloratum, methylenová modř



$C_{16}H_{18}ClN_3S$. nH_2O M_r bezvodého 319,85 CAS 61-73-4

Je to n-hydrát 3,7-bis(dimethylamino)fenothiazin-5-iumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{18}ClN_3S$.

Vlastnosti

Tmavě modrý krystalický prášek měďnatého lesku nebo zelené krystaly bronzového lesku. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 10 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 100 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 240 nm až 800 nm. Roztok vykazuje absorpční maxima při 255 nm až 260 nm, 285 nm až 290 nm, 675 nm až 685 nm a 740 nm až 750 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok. 10 mg *methylthioniniumchloridu pro vnější použití CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *1-propanolu R* (20 + 80) po dráze 8 cm. Vrstva se usuší na vzduchu chráněna před světlem a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na obou chromatogramech nad hlavní skvrnou může být přítomna ještě další skvrna.

C. Asi 1 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny octové ledové R*, 0,1 g *zinku práškového R* a zahřeje se k varu. Roztok se odbarví. Potom se zfiltruje a filtrát se protřepe. Roztok se na vzduchu zbarví modře.

D. 50 mg se žíhá s 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, ochladí se, zbytek se rozpustí v 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje. Filtrát bez dalšího přidání *kyseliny dusičné zředěné RS* vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Látky nerozpustné v methanolu. K 1,0 g se přidá 20 ml *methanolu R* a 5 min se vaří pod zpětným chladičem. Potom se zfiltruje přes předem zvážený filtr ze slinutého skla (40) a filtr se promývá *methanolem R*, až je filtrát bezbarvý. Potom se filtr vysuší při 100 °C a zváží. Zbytek váží nejvýše 10,0 mg (1,0 %).

Příbuzná barviva. 50 mg se rozpustí ve 100 ml *ethanolu R*. Roztok je tmavě modrý. K 0,5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *ethanolu R* a 1 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (4 g/l); roztok je modrý. Potom se přidá 0,1 ml *citronové silice R*, promíchá se a nechá se stát. Do 5 min vznikne růžové zbarvení.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Železo (*2.4.9*). K 1,0 g ve varné baňce se přidá 50 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny dusičné R* a směs se zahřeje k varu a vaří se tak dlouho, až se objem tekutiny zmenší asi na 15 ml. Ochladí se, přidá se 5 ml *kyseliny sírové R* a opět se zahřeje k varu. Potom se přidává po kapkách *kyselina dusičná R* až do odbarvení roztoku tak, že se před každým přidáním tekutina ochladí. Opět se zahřeje, až se začnou vyvíjet bílé dýmy. Jestliže tekutina tmavne, opakuje se přidávání *kyseliny dusičné R* zakončené zahřátím do vývinu bílých dýmů. Bezbarvá tekutina se ochladí, přidá se 10 ml nasyceného roztoku *šťavelanu amonného R* a zahřívá se k varu, až se zcela přestanou vyvíjet dýmy. Ochladí se a zředí se *vodou R* na 50 ml. 5 ml takto připraveného roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce na železo (100 µg/g).

Zinek. Zbytek získaný ve zkoušce Síranový popel se rozpustí ve 4,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, přidá se 1 ml *amoniaku zředěného RS2*, zahřeje se k varu a zfiltruje se. Filtrát se zředí *vodou R* na 10 ml a přidají se 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a potom se ke směsi přidá 0,5 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a protřepe se. Po 5 min neopalizuje roztok silněji než porovnávací suspenze III (*2.2.1*) (350 µg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). 8,0 % až 22,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,25 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí zahřátím ve 30 ml *vody R*, ochladí se, přidá se 50,0 ml *dichromanu draselného RS1* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Nechá se 10 min stát, potom se zfiltruje a prvních 20 ml filtrátu se odstraní. 50,0 ml filtrátu se převede do baňky se zábrusem, přidá se 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 8,0 ml *jodidu draselného RS* a nechá se stát 5 min chráněn před světlem. Potom se přidá 80 ml *vody R* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace. Provede se slepá zkouška.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,66 mg $C_{16}H_{18}ClN_3S$.

Uchovávání

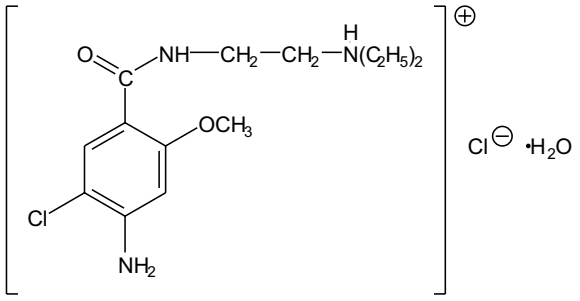
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Metoclopramidi hydrochloridum

Metoklopramidiumchlorid

Synonymum. Metoclopramidium chloratum



$C_{14}H_{23}Cl_2N_3O_2 \cdot H_2O$ M_r 354,28 CAS 54143-57-6

M_r bezvodého 336,26

Je to monohydrát [2-(4-amino-5-chlor-2-methoxybenzoylamino)ethyl]diethylamoniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{23}Cl_2N_3O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 183 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,0; měří se roztok S, viz Zkoušky na čistotu.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *metoklopramidiumchloridu CRL*. Měří se tablety látek s *chloridem draselným R*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm před postříkáním *dimethylaminobenzaldehydem RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 2 ml. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

E. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,40 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *metoklopramidiumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *2-diethylaminoethylaminu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, dioxanu R, methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 10 + 14 + 90) po dráze 12 cm. Nechá se vysušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Potom se vrstva postříká *dimethylaminobenzaldehydem RS1* a nechá se usušit na vzduchu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), která nebyla viditelná v ultrafialovém světle při 254 nm, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,5%).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,5 % až 5,5 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Zaznamená se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,63 mg $C_{14}H_{23}Cl_2N_3O_2$.

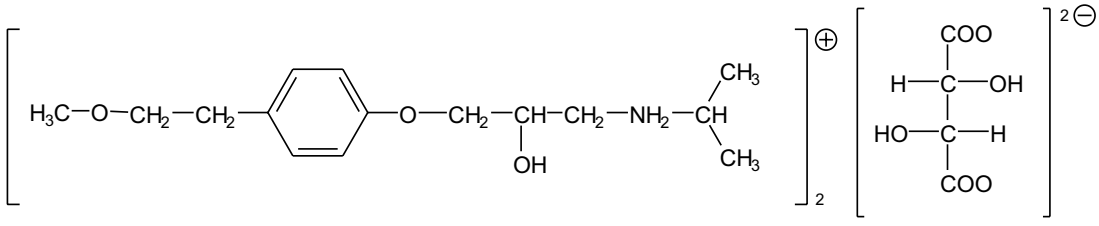
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Metoprololi tartras

Metoprololiumtartarat

Synonymum. Metoprololium tartaricum



$C_{34}H_{56}N_2O_{12}$ M_r 684,82 CAS 56392-17-7

Je to bis{(*RS*)-N-[2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]propyl]-N-isopropylamonium} (2*R*,3*R*)- -2,3-dihydroxybutandioat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{34}H_{56}N_2O_{12}$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v lihu 96%.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 121 °C až 124 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *metoprololiumtartaratu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, připraví se tablety *bromidu draselného R*, na které se nanese odděleně 25 μl roztoku zkoušené látky a referenční látky v *dichlormethanu R* (100 g/l), rozpouštědlo se odpaří a ihned se zaznamenají nová spektra.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 15 mg se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok (a). 15 mg *metoprololiumtartaratu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok (b). 15 mg *oxprenololiumchloridu CRL* a 15 mg *metoprololiumtartaratu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny chloristé R*, *methanolu R* a *vody R* (0,5 + 50 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje

s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

E. Vyhovuje zkoušce (b) na vínany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_8 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 7,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +7,0° až +10,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Příbuzné látky.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vhodné vrstvy silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 20 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 4 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku. Na dno chromatografické komory obsahující směs objemových dílů *methanolu R* a *ethylacetatu R* (20 + 80) se umístí dvě kádinky obsahující po 30 objemových dílech *amoniaku 26% R* a komora se sytí po dobu nejméně 1 h před použitím. Vyvíjí se po dráze 12 cm. Potom se vrstva suší volně na vzduchu nejméně 3 h a potom se vloží na nejméně 15 h do nádoby nasycené parami jodu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Nepřihlíží se ke skvrnám zůstávajícím na startu.

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *metoprololtartaratu CRL* a 3,0 mg *metoprololu nečistoty D CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí na 10,0 ml mobilní fází.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml. 3,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). V případě potřeby, viz níže, se tento roztok připravuje v digestoři. Použije se pouze ke stanovení retenčního času metoprololu nečistoty C.

10 mg *metoprololiumtartaratu CRL* se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS.*

Roztok se převede do odpařovací misky o průměru 10 cm. Miska se umístí tak, aby povrch roztoku byl vzdálen 5 cm od lampy emitující ultrafialové záření *(2.1.3)* o vlnové délce 254 nm, a ozařuje se 6 h. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,3 m a vnitřního průměru 3,9 mm naplněné vhodným *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),

- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: 3,9 g *octanu amonného R* se rozpustí v 810 ml *vody R*, přidají se 2,0 ml *triethylaminu R*, 10,0 ml *kyseliny octové ledové R*, 3 ml *kyseliny fosforečné R* a 190 ml *acetonitrilu R* a promíchá se. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 275 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C. Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona promývá do ustavení rovnováhy po dobu nejméně 20 min.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy: metoprololu asi 10 min; metoprololu nečistoty D asi 13,5 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je rozlišení mezi píky metoprololu nečistoty D a metoprololu nejméně 4,0. Podle potřeby se upraví obsah acetonitrilu v mobilní fázi.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,7násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). V případě, že kterýkoliv z těchto požadavků je překročen, a pokud se objeví pík s retenčním časem okolo 5 min (metoprolol nečistota C), připraví se porovnávací roztok (c). Nastříkne se postupně 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (c). Na chromatogramu zkoušeného roztoku se dělí plocha píku odpovídajícího hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (metoprolol nečistota C) deseti: tento podíl plochy není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,7násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům kyseliny vinné a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu nad *chloridem vápenatým bezvodým R*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,24 mg $C_{34}H_{56}N_2O_{12}$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

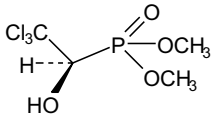
Pro kapalinovou chromatografii:
A. 1-(ethylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]-2-propanol,
B. 4-(2-methoxyethyl)fenol,
C. 4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)benzaldehyd,
D. 3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]-1,2-propandiol,
E. 1-isopropylamino-3-[2-(2-methoxyethyl)fenoxy]-2-propanol,
F. 1-isopropylamino-3-fenoxy-2-propanol,
G. 4-(2-hydroxyethyl)fenol,
H. 1-isopropylamino-3-[4-(2-hydroxyethyl)fenoxy]-2-propanol,
I. 1-isopropylamino-3-(4-vinylfenoxy)-2-propanol,
J. 3-{2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]propoxy}-1-isopropylamino-2-propanol,
K. (*E*)- a (*Z*)-1-isopropylamino-3-[4-(2-methoxyvinyl)fenoxy]-2-propanol,

Pro tenkovrstvou chromatografii:
L. 1,1′-oxybis[(3-isopropylamino)-2-propanol],
M. 1,3-di-isopropylamino-2-propanol,
N. 3-isopropylamino-1,2-propandiol,
O. isopropylamino-1,1′-bis-{3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]}-2-propanol.

Metrifonatum

1998

Metrifonat



a enantiomer

$C_4H_8Cl_3O_4P$ M_r 257,44 CAS 52-68-6

Je to (*RS*)-dimethyl-(1-hydroxy-2,2,2-trichlorethyl)fosfonat. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_4H_8Cl_3O_4P$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v dichlormethanu, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Taje při 76 °C až 81 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *metrifonatu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *metrifonatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, dioxanu R* a *toluenu R* (5 + 25 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *4-(4-nitrobenzyl)pyridinu R* (50 g/l) v *acetonu R* a suší se 15 min při 120 °C. Před ochlazením se postříká roztokem *tetraethylenpentaminu R* (100 g/l) v *acetonu R* a ihned se pozoruje. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Asi 20 mg se rozpustí v 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidá se 1 ml *pyridinu R,* protřepe se a 2 min se zahřívá na vodní lázni; organická vrstva se zbarví červeně.

D. K 0,1 g se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné R*, 0,5 ml roztoku *dusičnanu amonného R1* (500 g/l) a 0,1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R*, zahřívá se 10 min na vodní lázni. Pak se zahřeje k varu a přidá se 1 ml *molybdenanu hexaamonného RS;* vznikne žluté zbarvení nebo žlutá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 5,0 g se rozpustí ve 20 ml *methanolu R*. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, zředí se jí na 50 ml a přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *desmethylmetrifonatu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,10 g *dichlorvosu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *acetonitrilu R a vody R* a zředí se stejnou směsí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). Připraví se smícháním stejných objemových dílů zkoušeného roztoku, porovnávacího roztoku (a) a porovnávacího roztoku (b).
Porovnávací roztok (d). 4,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *acetonitrilu R a vody R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné vhodným oktadecylsilanizovaným silikagelem (10 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min a následujícím složením:
  - *mobilní fáze A* - roztok *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (1,36 g/l) upraveného na hodnotu pH 2,9 *kyselinou fosforečnou R*,
  - *mobilní fáze B - acetonitril R,*

Gradientový program:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0 - 5	90	10
5 - 25	90 → 85	10 → 15
25 - konec	85 → 45	15 → 55

- spektrofotometrického detektoru, 210 nm,
- elektronického integrátoru.

Kolona se promývá do ustavení rovnováhy po dobu 5 min stejnou směsí mobilních fází, jaká byla použita pro prvních 5 min v gradientovém programu, teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou píky eluovány v následujícím pořadí: desmethylmetrifonat, metrifonat a dichlorvos. Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (d) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu byla asi 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže je rozlišení mezi píkem desmethylmetrifonatu a píkem metrifonatu nejméně 3,0 a rozlišení mezi píkem metrifonatu a píkem dichlorvosu je nejméně 4,5.

Nastříkne se 50 μl zkoušeného roztoku, 50 μl porovnávacího roztoku (a) a 50 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogram zkoušeného roztoku se zaznamenává po dobu odpovídající 3násobku retenčního času metrifonatu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího desmethylmetrifonatu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); plocha píku odpovídajícího dichlorvosu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %); plocha píku, kromě hlavního píku, píků desmethylmetrifonatu a dichlorvosu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); součet ploch všech těchto píků není větší než 2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

Chloridy. Nejvýše 500 μg/g; 5,00 g se rozpustí v 30 ml *lihu 96% R* a přidá se směs obsahující 15 ml *kyseliny dusičné R* a 100 ml *vody R.* Titruje se *dusičnanem stříbrným 0,01 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) (použije se stříbrná elektroda).

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,01 mol/l VS* odpovídá 0,3546 mg Cl.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R.* 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 3,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 30 ml *lihu 96% R* a přidá se 10 ml *ethanolaminu R.* Ochlazuje se přidáváním chlazené směsi obsahující 15 ml *kyseliny dusičné R* a 100 ml *vody R;* teplota směsi se udržuje na 20 °C až 22 °C. Při udržování této teploty se titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) (použije se stříbrná elektroda).

Vypočítá se obsah $C_4H_8Cl_3O_4P$ v procentech, vzhledem k obsahu chloridů, za použití vzorce:

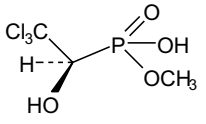
$$\left(\frac{V_p}{M_p} - \frac{V_{Cl}0{,}1}{M_{Cl}}\right) \cdot 25{,}74 \cdot \frac{1}{10} \cdot$$

v němž značí:
V_p - spotřebu dusičnanu stříbrného ve zkoušce stanovení obsahu v mililitrech,
M_p - navážku zkoušené látky ve zkoušce stanovení obsahu v gramech,
V_{Cl} - spotřebu dusičnanu stříbrného ve zkoušce na chloridy v mililitrech,
M_{Cl} - navážku zkoušené látky ve zkoušce na chloridy v gramech.

Uchovávání

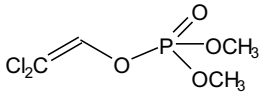
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

Nečistoty



a enantiomer

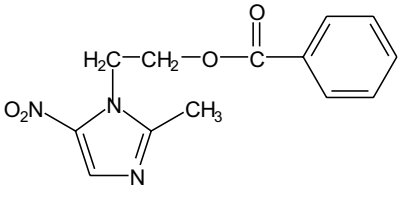
A. kyselina *(RS)*-methyl-(2,2,2-trichlor-1-hydroxyethyl)fosfonová (demethylmetrifonat),



B. (2,2-dichlorvinyl)dimethylfosfat (dichlorvos).

† Metronidazoli benzoas

Metronidazolbenzoat



$C_{13}H_{13}N_3O_4$ M_r 275,26 CAS 13182-89-3

Je to 2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethylbenzoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{13}N_3O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek nebo vločky. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 99 °C až 102 °C.

B. 0,100 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 220 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima; při 232 nm a 275 nm. Specifická absorbance v maximu při 232 nm je 525 až 575.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *metronidazol-benzoatu CRL*.

D. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. K asi 10 mg se přidá asi 10 mg *zinku práškového R*, 1 ml *vody R* a 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se 5 min zahřívá na vodní lázni a pak se ochladí. Roztok vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_3$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 2,0 g se rozpustí ve směsi 20 ml *dimethylformamidu R* a 20 ml *vody R* předem zneutralizované *kyselinou chlorovodíkovou 0,02 mol/l VS* nebo *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS* za použití 0,2 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*. Před použitím se deska 1 h zahřívá při 110 °C a nechá se ochladit.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *metronidazolbenzoatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *metronidazolu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). 10 mg *2-methyl-5-nitroimidazolu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (f). 10 mg *metronidazolu CRL* a 10 mg *2-methyl-5-nitroimidazolu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se *ethylacetatem R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající metronidazolu nebo 2-methyl-5-nitroimidazolu není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramech porovnávacího roztoku (d) a (e) (0,5 %). Žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících metronidazolu a 2-methyl-5-nitroimidazolu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 80 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g zkoušené látky se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,53 mg $C_{13}H_{13}N_3O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

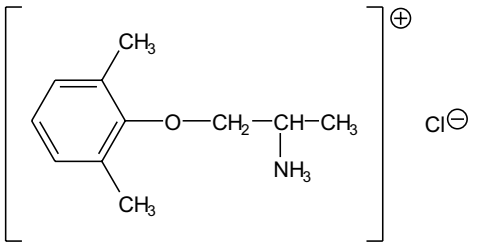
A. metronidazol,
B. 2-methyl-5-nitroimidazol.

---

† Mexiletini hydrochloridum

Mexiletiniumchlorid

Synonymum. Mexiletinium chloratum



$C_{11}H_{18}ClNO$ M_r 215,72 CAS 5370-01-4

Je to (*RS*)-1-(2,6-xylyloxy)-2-propylamoniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{18}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, mírně rozpustný v dichlormethanu a prakticky nerozpustný v etheru.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,1° až +0,1°; měří se roztok S, viz Zkoušky na čistotu.

B. 40,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,5 % (*V/V*) a zředí se jím na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 260 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je 10,9 až 12,1.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mexiletiniumchloridu CRL*. Jestliže se spektra získaná měřením látek v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *methanolu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *mexiletiniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *2,6-dimethylfenolu R* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 14 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Postříká se *ninhydrinem RS* a 15 min se zahřívá při 110 °C. Při obou detekcích hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže v ultrafialovém světle při 254 nm na chroma-togramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

E. 1,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *2,6-dimethylfenolu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *2,6-dimethylfenoxyacetonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 2,5 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (40 + 60) obsahující 6 g/l *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 2,9 g/l *laurylsíranu sodného R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 262 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (c). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška dvou hlavních píků na chromatogramu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (2,6-dimethylfenoxyaceton) a druhým píkem (mexiletin) je nejméně 2,0.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku, 20 μl porovnávacího roztoku (a) a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času mexiletinu (asi 8 min). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího 2,6-dimethylfenolu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %); plocha žádného dalšího píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší, než je 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

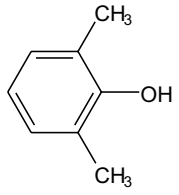
0,150 g se rozpustí v 50 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,57 mg $C_{11}H_{18}ClNO$.

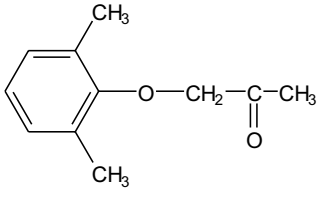
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Nečistoty



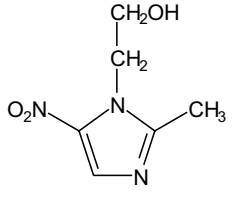
A. 2,6-dimethylfenol,



B. 2,6-dimethylfenoxyaceton.

† Metronidazolum

Metronidazol



$C_6H_9N_3O_3$ M_r 171,16 CAS 443-48-1

Je to 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_9N_3O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 159 °C až 163 °C.

B. 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 277 nm a minimum při 240 nm. Specifická absorbance v maximu je 365 až 395.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *metronidazolu CRL*.

D. K asi 10 mg se přidá asi 10 mg *zinku práškového R*, 1 ml *vody R* a 0,25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Směs se 5 min zahřívá ve vodní lázni a pak se ochladí; roztok vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 20 ml. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,3 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, lihu 96% R, diethylaminu R* a *chloroformu R* (1 + 10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,3 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1500 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

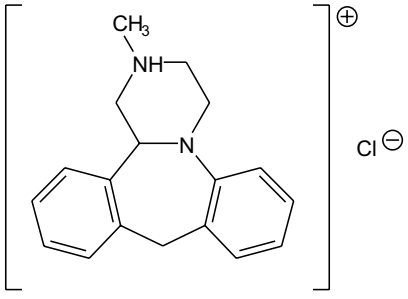
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,12 mg $C_6H_9N_3O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Mianserini hydrochloridum

Mianseriniumchlorid



$C_{18}H_{21}ClN_2$ M_r 300,83 CAS 21535-47-7

Je to (*RS*)-1,2,3,4,10,14b-hexahydro-2-methyldibenzo[*c,f*]pyrazinium[1,2-*a*]azepin-chlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{21}ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu a těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 279 nm. Specifická absorbance v maximu je 64 až 72.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mianseriniumchloridu CRL*. Měří se spektra látek s *chloridem draselným R* ve formě tablet. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *methanolu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *mianseriniumchloridu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *mianseriniumchloridu CRL* a 10 mg *cyproheptadiniumchloridu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *etheru R* a *cyklohexanu R* (5 + 20 + 75) po dráze 15 cm. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 5,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,10 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (1 + 4) na 200 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *methanolu R* (1 + 4) na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu studeného vzduchu a na 20 min se vystaví parám jodu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 3 h suší nad *oxidem fosforečným R* při 65 °C a při tlaku nepřevyšujícím 700 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

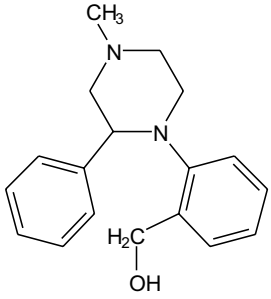
0,200 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,08 mg $C_{18}H_{21}ClN_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

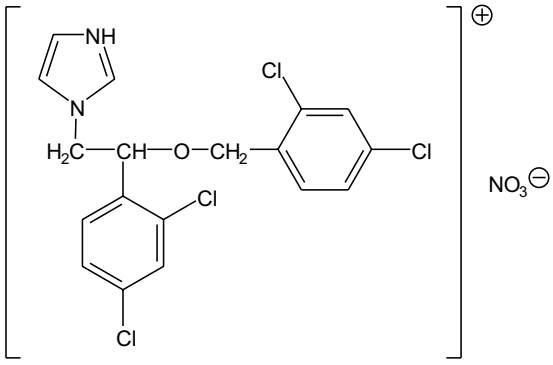


A. 1-[(2-hydroxymethyl)fenyl]-4-methyl-2-fenylpiperazin.

† Miconazoli nitras

Mikonazoliumnitrat

Synonymum. Miconazolium nitricum



$C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$ M_r 479,15 CAS 22832-87-7

Je to (*RS*)-1-[2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1*H*-imidazoliumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 178 °C až 184 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mikonazoliumnitratu CRL*. Měří se tablety látek připravených za použití *bromidu draselného R.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *mikonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *mikonazoliumnitratu CRL* a 30 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu, vystaví se parám jodu do vzniku skvrn a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou,

barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,10° až +0,10°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *mikonazoliumnitratu CRL* a 2,5 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min, kterou je roztok 6,0 g *octanu amonného R* ve směsi 300 ml *acetonitrilu R,* 320 ml *methanolu R* a 380 ml *vody R,*
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm.

Kolona se ustaluje 30 min promýváním mobilní fází s průtokovou rychlostí 2 ml/min.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Jestliže jsou chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, retenční časy jsou: ekonazoliumnitratu asi 10 min, mikonazoliumnitratu asi 20 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím ekonazoliumnitratu a píkem odpovídajícím mikonazoliumnitratu není menší než 10. V případě potřeby se upraví složení mobilní fáze.

Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,2násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku dusičnanového iontu a k žádnému píku, jehož plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

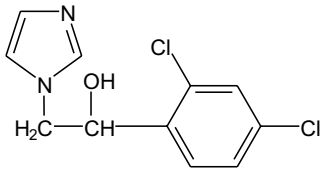
0,350 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 75 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 47,91 mg $C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$.

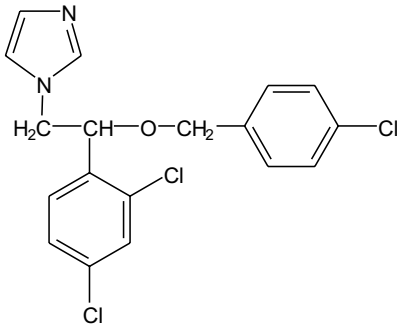
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

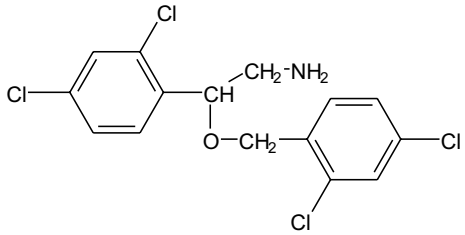
Nečistoty



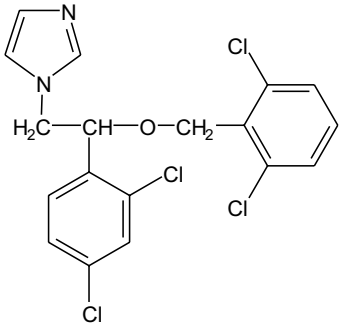
A. (*RS*)-1-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1-imidazolyl)ethanol,



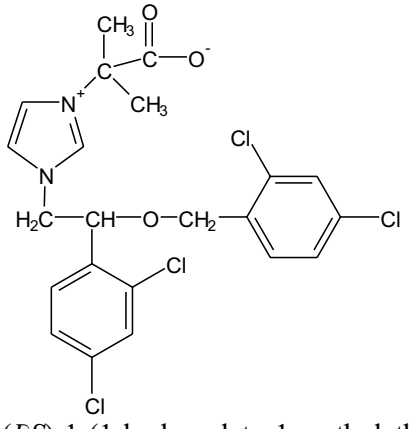
B. (*RS*)-1-[2-(4-chlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol,



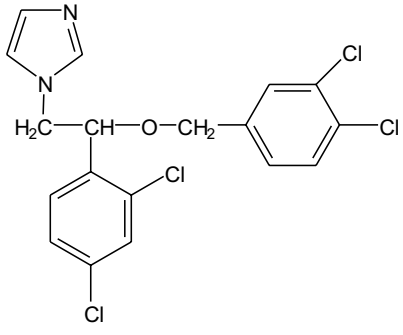
C. (*RS*)-2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethylamin,



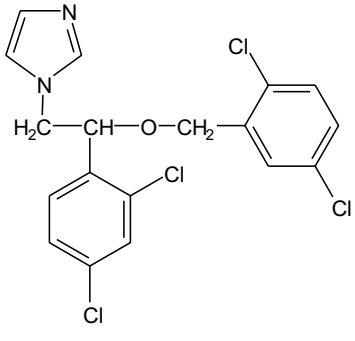
D. (*RS*)-1-[2-(2,6-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol,



E. (*RS*)-1-(1-karboxylato-1-methylethyl)-3-[2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-imidazolium,



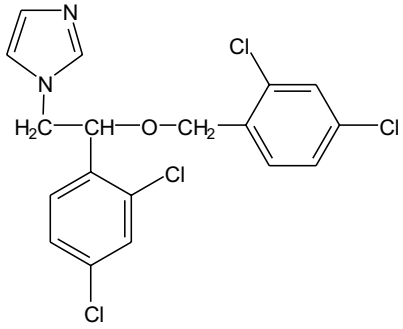
F. (*RS*)-1-[2-(3,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol,



G. (*RS*)-1-[2-(2,5-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol.

† Miconazolum

Mikonazol



$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ M_r 416,13 CAS 22916-47-8

Je to (*RS*)-1-[2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]-1*H*-imidazol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96%.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 83 °C až 87 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *mikonazolu CRL*. Měří se tablety látek připravených za použití *bromidu draselného R.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného.

Zkoušený roztok. 30 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *mikonazolu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 30 mg *mikonazolu CRL* a 30 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 5 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *octanu amonného RS*, *dioxanu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu teplého vzduchu, vystaví se parám jodu do vzniku skvrn a pozoruje se v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou, barvou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K 30 mg v porcelánovém kelímku se přidá 0,3 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a zahřívá se 10 min nad otevřeným plamenem. Po ochlazení se zbytek smíchá s 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,10° až +0,10°; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,5 mg *mikonazolu CRL* a 2,5 mg *ekonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (3 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min, kterou je roztok 6,0 g *octanu amonného R* ve směsi 300 ml *acetonitrilu R,* 320 ml *methanolu R* a 380 ml *vody R,*
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm.

Kolona se ustaluje 30 min promýváním mobilní fází s průtokovou rychlostí 2 ml/min.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (a). Jestliže jsou chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, retenční časy jsou: ekonazoliumnitratu asi 10 min, mikonazolu asi 20 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím ekonazoliumnitratu a píkem odpovídajícím mikonazolu není menší než 10. V případě potřeby se upraví složení mobilní fáze.

Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,2násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k žádnému píku, jehož plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *2-butanonu R* (1 + 7) a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny oranžově žlutého zbarvení na zelené.

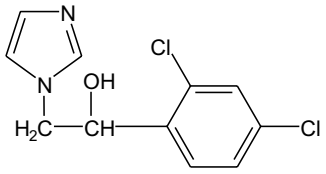
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,61 mg $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$.

Uchovávání

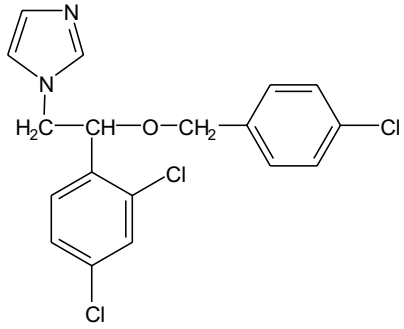
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

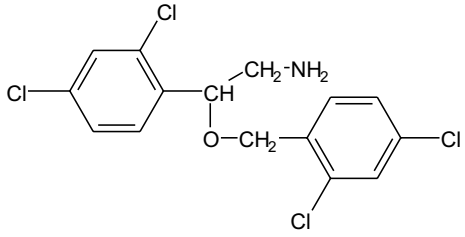
A. mikonazoliumnitrat,



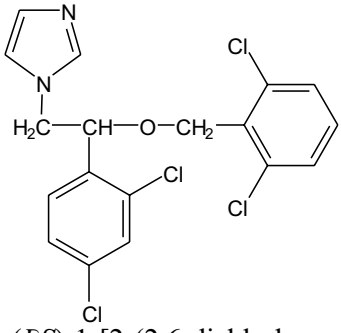
B. (*RS*)-1-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1-imidazolyl)ethanol,



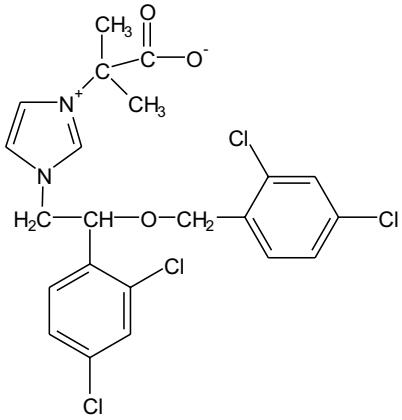
C. (*RS*)-1-[2-(4-chlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol,



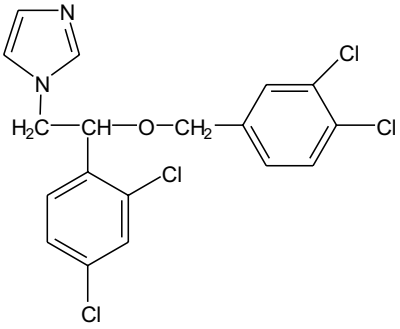
D. (*RS*)-2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)-ethylamin,



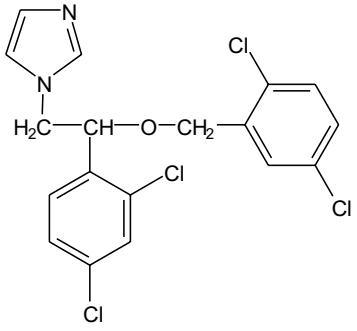
E. (*RS*)-1-[2-(2,6-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol,



F. (*RS*)-1-(1-karboxylato-1-methylethyl)-3-[2-(2,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)-ethyl]imidazolium,



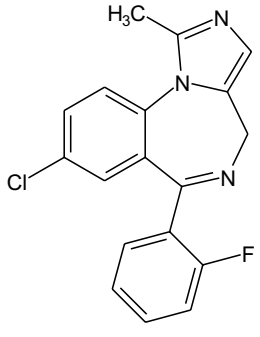
G. (*RS*)-1-[2-(3,4-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol,



H. (*RS*)-1-[2-(2,5-dichlorbenzyloxy)-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl]imidazol.

§ Midazolamum

Midazolam



$C_{18}H_{13}ClFN_3$ M_r 325,77 CAS 59467-70-8

Je to 8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{18}H_{13}ClFN_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%, dobře rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 161 °C až 164 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *midazolamu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. 90 mg se smíchá s 0,30 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a žíhá se v kelímku, dokud se nezíská téměř bílý zbytek (většinou méně než 5 min). Nechá se vychladnout a zbytek se rozpustí v 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Roztok se zfiltruje (filtrát se použije také pro zkoušku totožnosti E). 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS*, promíchá se, nechá se 5 min stát a porovná se s barvou kontrolního roztoku připraveného stejným způsobem. Roztok vzorku je žlutý a kontrolní roztok je červený.

E. K 1 ml filtrátu ze zkoušky totožnosti D se přidá 1 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 8 mg *midazolamu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 8 mg *midazolamu CRL* a 8 mg *chlordiazepoxidu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (2 + 15 + 20 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky v platinovém kelímku.

Stanovení obsahu

0,120 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 20 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) do druhého inflexního bodu.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,29 mg $C_{18}H_{13}ClFN_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

Nečistoty

A. 8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-5,6-dihydro-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepin,
B. 8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-1-methyl-6*H* -imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepin,
C. kyselina 8-chlor-6-(2-fluorfenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepin-3-karboxylová.

Millefolii herba

N

Řebříčková nať

Synonymum. Herba millefolii

Celé nebo řezané usušené kvetoucí vrcholky druhu *Achillea millefolium* L. Obsahuje nejméně 2 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga nevýrazného charakteristického pachu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listy zelené až šedozelené, na spodní straně slabě pýřité, na svrchní straně pýřité, dvakrát až třikrát peřenosečné; úkrojky listů čárkovité.

Květenství chocholičnaté, úbory o průměru 3 mm až 5 mm. Zákrov polokulovitý, víceřadý, listeny střechovitě uspořádány, na okrajích s nahnědlým nebo bílým lemem. Květní lůžko vypuklé, plevkaté; terčové květy oboupohlavné, koruna trubkovitá, pěticípá, nažloutlá nebo nahnědlá; jazykovité květy samičí, koruna bílá, nažloutlá nebo narůžovělá, podlouhle vejčitě trojzubá.

Stonek pýřitý, zelený, hnědě nebo fialově naběhlý, podélně rýhovaný, až 3 mm silný, uvnitř vyplněn bílou dření.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelený až šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky stonků, listů a listenů s dvouřadými, šestibuněčnými až desetibuněčnými žláznatými chlupy a jednořadými, čtyřbuněčnými až šestibuněčnými krycími chlupy s koncovou buňkou ztlustlou, často poněkud zkroucenou, 400 μm až 1000 μm dlouhými; úlomky koruny s buňkami pokožky papilózně vychlípenými; okrouhlá pylová zrna o průměru 30 μm, se třemi klíčními póry a ostnitou exinou; úlomky stonku s cévami a svazky vláken.

C. 2 g práškované drogy (710) se po částech převedou do chromatografické kolony o vnitřním průměru 8 mm až 9 mm a délky 150 mm. Uzavře se chomáčkem vaty, droga se stlačí skleněnou tyčinkou a promyje se 10 ml *dichlormethanu R.* Eluát se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek

se rozpustí v 0,5 ml *toluenu R.* Roztok se použije i ke Zkoušce totožnosti D. 2,5 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS3* se smíchá s 0,1 ml roztoku a zahřívá se 2 min na vodní lázni. Po ochlazení se intenzivně protřepe s 5 ml *etheru petrolejového R;* spodní vrstva se zbarví modře nebo zelenomodře.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. Použije se roztok ze Zkoušky totožnosti C.
Porovnávací roztok. 10 mg *cineolu R* a 10 mg *guajazulenu R* se rozpustí ve 20 ml *toluenu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně guajazulenu na chromatogramu porovnávacího roztoku. V poloze vymezené skvrnami guajazulenu a cineolu na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrny dvě červenofialové skvrny. Na chromatogramu mohou být patrné i další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 5 % stonků o průměru větším než 3 mm.

Číslo hořkosti. Nejméně 5000. Provádí se srovnáním s chininiumchloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000. Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění, které chutná ještě hořce.

Základní roztok chininiumchloridu. 0,100 g *chininiumchloridu R* se rozpustí ve 100,0 ml *vody R.* 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 1,00 g práškované drogy (710) se přelije 1000 ml vroucí *vody R* a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, prvních 20 ml filtrátu se odstraní.

Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 4,2 ml základního roztoku chininiumchloridu a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Určí se roztok nejnižší koncentrace, který chutná ještě hořce. 10,0 ml roztoku nejnižší koncentrace se převaluje v ústech 30 s tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka. Jestliže roztok nechutná hořce, vyplivne se a po 1 min se ústa vypláchnou vodou. Po 10 min se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor *k* se vypočítá ze vztahu:

$$2\frac{5{,}00}{n} ,$$

v němž značí:
n - počet ml základního roztoku chininiumchloridu, který chutnal ještě hořce.
10/*k* ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku chutná hořce.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 0,500 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 1,0 %.

Stanovení obsahu

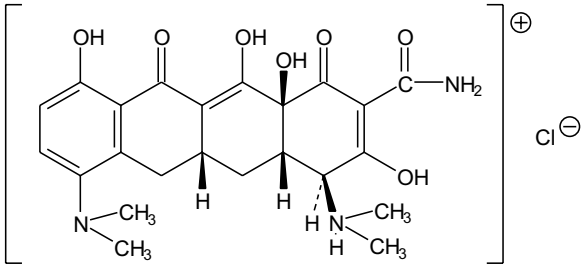
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 40,0 g řezané drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 1000ml baňce s 500 ml směsi objemových dílů *vody R* a *ethylenglykolu R* (1 + 9); do dělené trubice se přidá 0,2 ml *xylenu R*. Po 2 h se vypne chlazení a pokračuje se v destilaci, dokud modře zbarvená silice nedosáhne spodní části chladiče, pak se opět zapne chlazení tak, aby se nezahřívala separační část. Destilace se ukončí. 1000ml destilační baňka se nahradí 250ml baňkou. Destiluje se 15 min směs složená z 50 ml *vody R* a 0,4 ml *xylenu R*. Po 10 min od ukončení destilace se odečte celkový objem destilátu. Provede se slepé stanovení. Destiluje se 15 min v baňce na 250 ml směs složená z 50 ml *vody R* a 0,4 ml *xylenu R;* do dělené trubice se přidá 0,2 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Minocyclini hydrochloridum

Minocykliniumchlorid



$C_{23}H_{28}ClN_3O_7$ M_r 493,94 CAS 13614-98-7

Je to (4*S*,4a*S*,5a*R*,12a*S*)-4-(1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,10,12,12a-tetrahydroxy-2-karbamoyl-7-dimethylamino-1,11-dioxonaftacenyl)dimethylamoniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 102,5 % sloučeniny $C_{23}H_{28}ClN_3O_7$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický hygroskopický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na hodnotu 9,0, asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm. Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *minocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *minocykliniumchloridu CRL* a 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vznikne jasně žluté zbarvení. K roztoku se přidá 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní na bledě žluté.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,100 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. 1,0 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok $Ž_4$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 4,5; měří se roztok S.

Světlo absorbující nečistoty. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku S do 1 h po jeho přípravě při 560 nm; absorbance není vyšší než 0,06.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu.

Nastříknou se odděleně porovnávací roztoky (b) a (c). Nastříkne se zkoušený roztok (a) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající nejméně 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha píku odpovídajícího 4-epiminocyklinu není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,2 %); plocha žádného píku nacházejícího se mezi píkem rozpouštědla a píkem 4-epiminocyklinu nebo jakéhokoliv píku na sestupné části hlavního píku není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,2 %) a součet ploch takových píků není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 5,0 % až 8,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1,25 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 10,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 12,5 mg *minocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *minocykliniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml. 5 ml tohoto roztoku se 60 min zahřívá na vodní lázni a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí v 25 ml mobilní fáze.

Zkouška se provádí za ochrany před přímým světlem. Roztoky se uchovávají při teplotě 2 °C až 8 °C a použijí se do 3 h od přípravy.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,20 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *edetanu disodného R* (4 g/l), *dimethylformamidu R* a roztoku *šťavelanu amonného R* (28 g/l) (25 + 27 + 50) a jejíž pH bylo upraveno roztokem *tetrabutylamoniumhydroxidu R* (104 g/l) na hodnotu 7,0. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (d). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky není menší než 2. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku minocyklinu nejvýše 1,5 % a jestliže počet teoretických pater vypočítaný z píku minocyklinu je nejméně 15 000 na metr. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

Obsah $C_{23}H_{28}ClN_3O_7$ se vypočítá v procentech.

Uchovávání

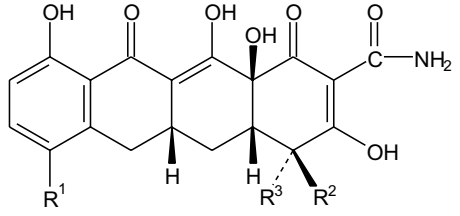
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty



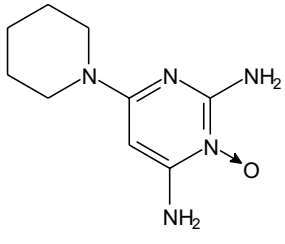
A. $R^1 = N(CH_3)_2$, $R^3 = N(CH_3)_2$, $R^2 = H$: (4*R*,4*aS*,5*aR*,12*aS*)-4,7-bis(dimethylamino)-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-oktahydro-3,10,12,12*a*-tetrahydroxy-1,11-dioxonaftacen-2-karboxamid (4-epiminocyklin),

B. $R^1 = H$, $R^3 = H$, $R^2 = N(CH_3)_2$: (4*S*,4*aS*,5*aR*,12*aS*)-4-dimethylamino-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-oktahydro-3,10,12,12*a*-tetrahydroxy-1,11-dioxonaftacen-2-karboxamid (sancyklin),

C. $R^1 = NHCH_3$, $R^3 = H$, $R^2 = N(CH_3)_2$: (4*S*,4*aS*,5*aR*,12*aS*)-4-dimethylamino-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-oktahydro-3,10,12,12*a*-tetrahydroxy-7-methylamino-1,11-dioxonaftacen-2-karboxamid (7-monodemethylminocyklin).

† Minoxidilum

Minoxidil



$C_9H_{15}N_5O$ M_r 209,25 CAS 38304-91-5

Je to 2,4-diamino-6-(1-piperidyl)pyrimidin-3-oxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{15}N_5O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a v propylenglykolu, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml (roztok a). 2,0 ml roztoku (a) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml (roztok b) a 2,0 ml roztoku (a) se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml (roztok c). Změří se absorbance (*2.2.25*) roztoků (b) a (c) při 200 nm až 350 nm. Roztok (b) vykazuje dvě absorpční maxima, při 230 nm a 281 nm. Specifická absorbance v maximu při 230 nm je 1015 až 1120 a v maximu při 281 nm je 1060 až 1170. Roztok (c) vykazuje tři absorpční maxima, při 230 nm, 262 nm a 288 nm. Specifická absorbance v maximu při 230 nm je 1525 až 1685, v maximu při 262 nm je 485 až 535 a v maximu při 288 nm je 555 až 605.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *minoxidilu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *minoxidilu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1,5 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 10 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R,* přidá se 0,1 ml *síranu měďnatého RS;* vzniká zelené zbarvení, které se změní po přidání 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* na zelenožluté.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v 12,5 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *deoxyminoxidilu (minoxidil nečistota E) CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,10 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok připravený následovně: 3,0 g *dokusatu sodného R* se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové ledové R* a 300 ml *vody R*, pH se upraví *kyselinou chloristou R* na hodnotu 3,0 a přidá se 700 ml *methanolu R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 240 nm,
- injektorové smyčky, 10 μl.

Nastříkne se odděleně po 10 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píky odpovídajícími minoxidilu a deoxyminoxidilu je nejméně 2,0. Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,1 % plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,93 mg $C_9H_{15}N_5O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

A. 2,4-diamino-6-chlorpyrimidin-3-oxid,
B. 2,4-diamino-6-chlorpyrimidin,
C. 3-(kyanimino)-3-(1-piperidyl)propionamid,
D. 2,4-diamino-6-{[(4-methylfenyl)sulfonyl]oxy}pyrimidin-3-oxid,
E. 2,4-diamino-(1-piperidyl)pyrimidin (deoxyminoxidil).

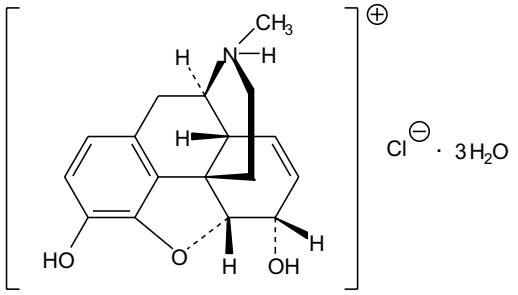
---

§§ Morphini hydrochloridum

1998

Morfiniumchlorid

Synonymum. Morphinium chloratum



$C_{17}H_{20}ClNO_3 . 3H_2O$ M_r 375,85 CAS 6055-06-7

M_r bezvodého 321,80

Je to trihydrát 4,5α-epoxy-3,6α-dihydroxy-17-methyl-7-morfineniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{20}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé hedvábně lesklé jehlice nebo kubické krystaly; v suché atmosféře zvětrává. Je dobře rozpustný ve vodě a v glycerolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 285 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 41.

B. 10 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 265 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 298 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 70.

C. K asi 1 mg upráškované zkoušené látky se v porcelánové misce přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a 0,05 ml *formaldehydu R;* vzniká červenofialové zbarvení, které přechází na fialové.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 0,15 ml čerstvě připraveného roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (10 g/l) a 0,05 ml *chloridu železitého RS1;* ihned vznikne modré zbarvení.

E. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *peroxidu vodíku zředěného RS*, 1 ml *amoniaku zředěného RS1* a 0,05 ml roztoku *síranu měďnatého R* (40 g/l); vzniká červené zbarvení.

F. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

G. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok $Ž_6$ nebo $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Zbarvení indikátoru se změní přidáním nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* nebo 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -110° až -115°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *kodeiniumdihydrogenfosfatu R* se rozpustí v 5 ml zkoušeného roztoku. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *toluenu R*, *lihu R* 70% *(V/V)*, *acetonu R* a *amoniaku 26% R* (35 + 35 + 32,5 + 2,5) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu, postříká se *jodobismutitanem draselným RS* a suší se 15 min v proudu vzduchu. Postříká se *peroxidem vodíku zředěným R*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající kodeinu intenzivnější než skvrna kodeinu na

chromatogramu porovnávacího roztoku (1 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny kodeinu, není intenzivnější než skvrna odpovídající morfinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Mekonat. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* absorbance *(2.2.25)* měřená při 480 nm není větší než 0,05 (0,2 %). Jako kontrolní tekutina se použije roztok připravený současně stejným způsobem za použití 10 ml *vody R* místo roztoku S.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 12,0 % až 15,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 130 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Po ochlazení se přidá 6 ml *octanu rtuťnatého RS*, 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*.

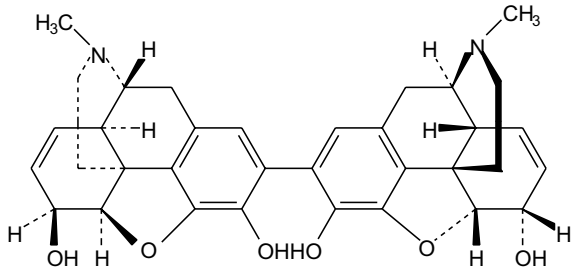
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,18 mg $C_{17}H_{20}ClNO_3$.

Uchovávání

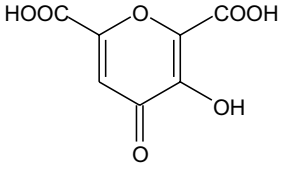
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Omamná látka.

Nečistoty

A. kodein,



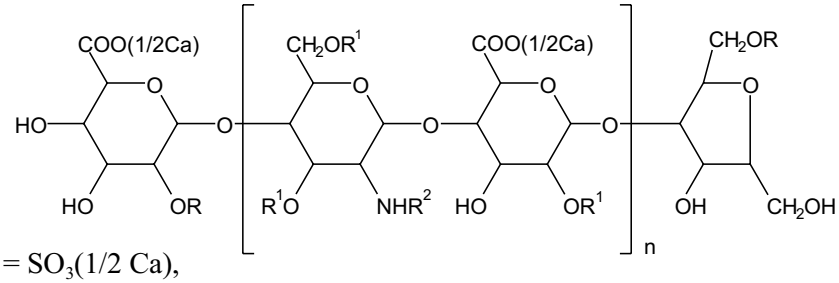
B. 2,2′-bismorfin (pseudomorfin),



C. kyselina 3-hydroxy-4-oxo-4*H*-pyran-2,6-dikarboxylová (kyselina mekonová).

† Nadroparinum calcicum

Vápenatá sůl nadroparinu



R = SO_3(1/2 Ca),
R^1 = H nebo SO_3(1/2 Ca),
R^2 = H nebo SO_3(1/2 Ca) nebo CO–CH_3.

Je to vápenatá sůl nízkomolekulárního heparinu získaného depolymerací heparinu z prasečí střevní sliznice kyselinou dusitou a následnou frakcionací k selektivní eliminaci většiny řetězců s molekulovou hmotností nižší než 2000. Většina složek má na neredukujícím konci řetězce strukturu kyseliny 2-O-sulfo-α-L-idopyranosuronové a na redukujícím konci řetězce strukturu 6-O-sulfo-2,5-anhydro-D-mannitolu.

Vyhovuje článku Heparina massae molecularis minoris s modifikacemi a dodatečnými následujícími požadavky.

Průměrná molekulová hmotnost se pohybuje mezi 3600 a 5000 s průměrnou hodnotou 4300. Hmotnostní procento řetězců nižších než 2000 je nejvýše 15 %. Hmotnostní procento řetězců mezi 2000 a 8000 se pohybuje mezi 75 % a 95 % s průměrnou hodnotou 85 %. Hmotnostní procento řetězců mezi 2000 a 4000 se pohybuje mezi 35 % a 55 % s průměrnou hodnotou 45 %.

Stupeň sulfatace je asi 2 na disacharidovou jednotku.

Počítáno na vysušenou látku, účinnost je 95 m.j. až 130 m.j. účinnosti anti-faktoru X_a na miligram. Poměr účinnosti anti-faktoru X_a k účinnosti anti-faktoru IIa je 2,5 až 4,0.

Zkoušky totožnosti

Provede se zkouška totožnosti C uvedená v článku *Heparina massae molecularis minoris.*

Průměrná molekulová hmotnost a hmotnostní procenta řetězců odpovídají hodnotám uvedeným v záhlaví tohoto článku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R.* Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II).*

Ethanol. Nejvýše 1,0 %; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28, Metoda II)* za použití 2-propanolu jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 ml *2-propanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 1,0 ml *ethanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 20,0 ml.

Plnění nádobek. Do čtyř jednotlivých nádobek, které mohou být vzduchotěsně uzavřeny a jsou kompatibilní se vstřikovacím systémem, se odměří:
- 1,0 ml *vody R* (slepá zkouška),
- 0,50 ml porovnávacího roztoku a 0,50 ml roztoku vnitřního standardu (porovnávací nádobka),
- 10,0 mg zkoušené látky. Přidá se 1,0 ml *vody R* (zkušební nádobka A),
- 10,0 mg zkoušené látky. Přidá se 0,50 ml *vody R* a 0,50 ml roztoku vnitřního standardu (zkušební nádobka B).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- niklové kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (150 µm až 180 µm),
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 250 °C. Každá nádobka se uvede do rovnovážného stavu v head-space systému za 15 min při 90 °C. Doba tlakování před nástřikem je 1 min.

Na chromatogramu roztoku z porovnávací nádobky jsou dva píky, které odpovídají podle pořadí vzrůstajícího retenčního času ethanolu a 2-propanolu (s retenčními časy přibližně 2,5 min a 4 min). Obsah ethanolu ve zkoušené látce se vypočítá za použití hustoty, jejíž hodnota činí 0,792 g/ml při 20 °C.

N-NO skupiny. Nejvýše 0,25 µg/g; stanoví se po rozštěpení N-NO vazby kyselinou bromovodíkovou v ethylacetatu pod zpětným chladičem a stanovením NO chemiluminiscencí.

Popis přístroje, viz obrázek 1 s popisem.

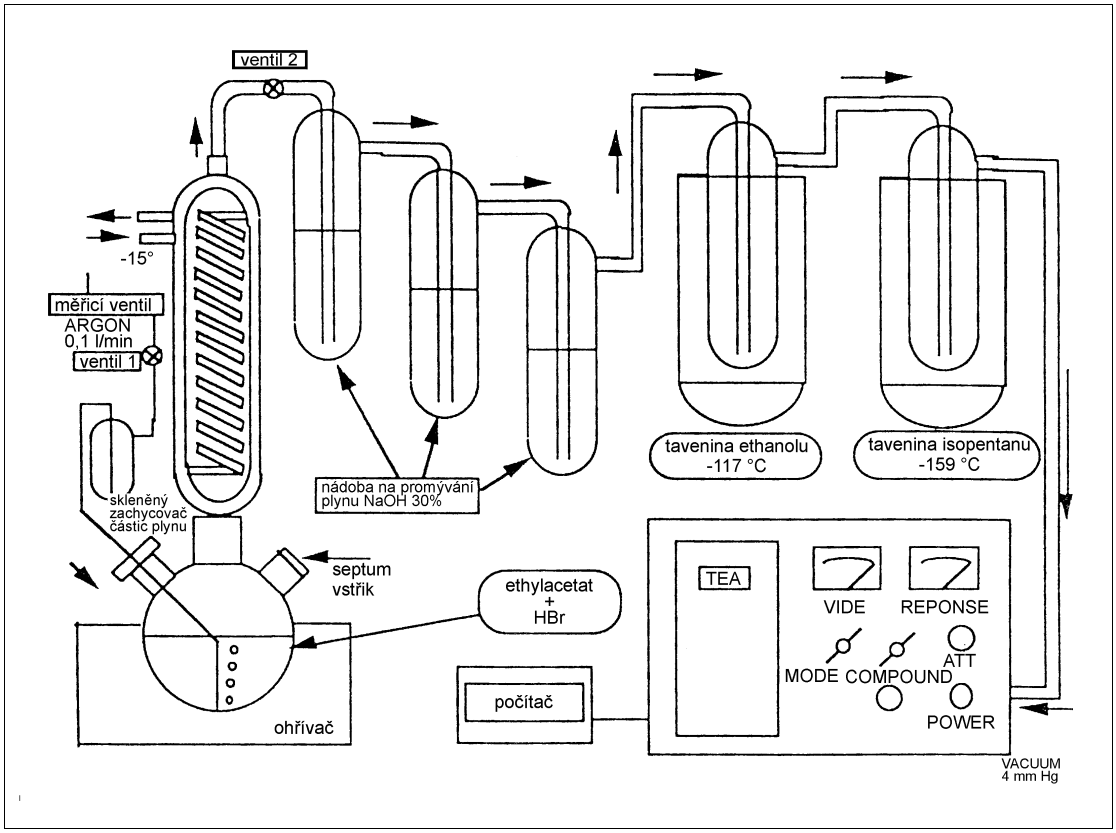
Použije se 500ml baňka s kulatým dnem z borokřemičitého skla, na kterou je připojen chladič a která je opatřena:
- na jedné straně spojkou torion, kterou může být zaváděn kanylou proud *argonu R*,
- na druhé straně šroubovou spojkou opatřenou ventilem se septem, kterým se vstřikuje porovnávací roztok a zkoušený roztok.

Baňka s kulatým dnem je připojena k řadě za sebou spojených tří probublávacích odlučovačů, které jsou připojeny ke dvěma vymrazovacím odlučovačům spojeným otočným uzávěrem s chemiluminiscenčním detektorem. Vhodnými dobře těsnícími trubičkami je zajištěno spojení.

Příprava chemiluminiscenčního detektoru. Chemiluminiscenční detektor se zapne 48 h před použitím a zapne se vakuová pumpa. Vakuum musí být nižší než 0,5 mm rtuti. Jednu hodinu před použitím se otevře kyslíkový ventil pod tlakem 200 kPa a průtokovou rychlostí 9,4 ml/min.

Příprava probublávacího odlučovače. Do každého probublávacího odlučovače se přenese 30 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (300 g/l) ve *vodě R.*

Příprava vymrazovacího odlučovače:
- odlučovač při -120 °C. Kapalný dusík se pomalu přidává do termosky obsahující 250 ml *ethanolu R* za míchání dřevěným míchadlem, dokud nevznikne pasta. Chladný odlučovač se umístí do připravené termosky, jak je popsáno,
- odlučovač při -160 °C. Kapalný dusík se pomalu přidává do termosky obsahující 250 ml *2-methylbutanu R* za míchání dřevěným míchadlem, dokud nevznikne pasta. Chladný odlučovač se umístí do připravené termosky, jak je popsáno.



Obr. 1. Přístroj na stanovení N-NO skupin

Probublávací odlučovač. Výška 24 cm, vnitřní průměr 2,5 cm, délka vnitřní trubice 23 cm s vnitřním průměrem 0,5 cm. Centrální umístění objímkou Rotulex. Opatřen spojkami torion na přívodu a odvodu.
Chemiluminiscenční detektor.
Vymrazovací odlučovač. Výška 16,5 cm, vnitřní průměr 4 cm, vnitřní trubice délky 14 cm s vnitřním průměrem 1,3 cm. Opatřen je spojkami torion na přívodu a odvodu.
Chladič. Výška 21 cm, vnitřní průměr 3 cm. Spodní spojka rodavis a horní spojka torion.
Nádoba, baňka s kulatým dnem z borokřemičitého skla opatřená centrální spojkou rodavis, spojkou torion na levém hrdle a šroubovou spojkou s 15 závity na pravém hrdle.
Izotermická nádoba. Vnitřní hloubka 22 cm, vnitřní průměr 8 cm.
Septum. Silikonový materiál, průměr 14 mm, tloušťka 3,5 mm.
Spojka torion.
Materiál na spojování trubic. Polytetrafluoroethylenové hadice, vnitřní průměr 3,2 mm, tloušťka 0,8 mm.

Sušení 500ml baňky s kulatým dnem z borokřemičitého skla a chladiče. 50 ml *ethylacetatu R* se vaří pod zpětným chladičem 1 h pod *argonem R* bez spojení systému s chemiluminiscenčním detektorem.

Zkoušený roztok. Zkoušená látka se suší 12 h nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C ve vakuu. 0,10 g upravené zkoušené látky se rozpustí v 1,0 ml *formamidu upraveném R.* Získaný roztok se třepe 30 min.

Porovnávací roztok. 0,1 ml *nitrosodipropylaminu RS* se zředí *ethanolem R* na 6,0 ml. 0,1 ml tohoto roztoku se zředí *formamidem upraveným R* na 1,0 ml. (Tento roztok odpovídá 0,05 µg N-NO skupin/ml.)

50 ml *ethylacetatu upraveného R* se přemístí do 500ml baňky s kulatým dnem z borokřemičitého skla opatřené septem. Baňka s kulatým dnem se připojí k chladiči, který byl předtím chlazen 2 h při -15 °C. Připojí se kanyla pro zavádění *argonu R* a upraví se průtoková rychlost na 0,1 l/min.

Zkontroluje se těsnost systému. Jen přípojka k chemiluminiscenčnímu detektoru se nechá otevřená pro odstranění přebytečného tlaku.

Ethylacetat upravený R se zahřeje k varu.

Systém se evakuuje pomalým otáčením ventilu chemiluminiscenčního detektoru. Současně se uzavře přívod chemiluminiscenčního detektoru.

Když je systém v rovnováze, vakuum dosahuje 4 mm sloupce rtuti.

Signál seřizovače nuly na chemiluminiscenčním detektoru se nastaví na 10 % rozsahu stupnice zapisovače. Skrz septum 500ml baňky s kulatým dnem z borokřemičitého skla se postupně za sebou vstříkne 0,5 ml *vody R*, 2,0 ml *kyseliny bromovodíkové zředěné RS* a potom další 2,0 ml *kyseliny bromovodíkové zředěné RS* pro ubezpečení, že pisátko zapisovače se vrátilo na základní linii mezi každým vstřikem.

Vstříkne se 50,0 µl porovnávacího roztoku a po vrácení pisátka zapisovače na základní linii 50,0 µl zkoušeného roztoku. Vypočítá se obsah N-NO skupin zkoušené látky.

Volné sírany. Nejvýše 0,5 %; provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)* za použití přístroje s vodivostním detektorem.

Zkoušený roztok. 30,0 mg zkoušené látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,4787 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou destilovanou R* na 200,0 ml (5 µg SO_4/ml).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- aniontové dělicí kolony délky 5 cm a vnitřního průměru 4,6 mm,
- chemického neutralizačního systému: neutralizační mikromembrána v řadě s mobilní fází pro detekci aniontů,
- vymytí roztokem 1,91 g *boritanu sodného R* v 1000 ml *vody R* jako mobilní fází po dobu 15 min. 100% výměna *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* během 0,5 min, kterým se vymývá po dobu 10 min. Počáteční podmínky se vrátí během 0,5 min. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- detektoru s citlivostí 30 µS.

Chemický neutralizační systém se čerpá nepřetržitě v protiproudu s roztokem *kyseliny sírové R* (2,45 g/l) s průtokovou rychlostí 4 ml/min.

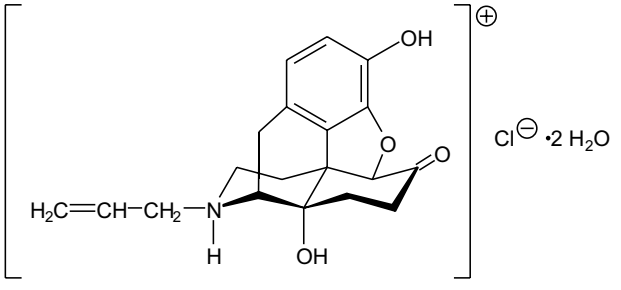
Nastříkne se 50 µl každého roztoku. Chromatogram porovnávacího roztoku vykazuje hlavní pík, který odpovídá síranovému iontu (retenční čas asi 7,5 min). V případě nutnosti se složení mobilní fáze upraví pro dosažení předepsaného retenčního času. Vypočítá se obsah síranů zkoušené látky.

Uchovávání

Separandum.

† Naloxoni hydrochloridum

Naloxoniumchlorid



$C_{19}H_{22}ClNO_4 \cdot 2H_2O$ M_r 399,87 CAS 51481-60-8

M_r bezvodého 363,84

Je to dihydrát (5*R*,9*R*,13*S*,14*S*)-17-allyl-4,5α-epoxy-3,14-dihydroxy-6-oxo-morphinaniumchloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{19}H_{22}ClNO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *naloxoniumchloridu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10,0 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS.* Ke změně zbarvení roztoku se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* nebo nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -170° až -181°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.* Těsně před použitím se vrstva zahřívá 15 min při 105 °C.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *naloxoniumchloridu CRL* se rozpustí ve 2 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se chráněna před světlem směsí objemových dílů *methanolu R* a horní vrstvy směsi 60 ml *amoniaku zředěného RS2* a 100 ml *1-butanolu R* (5 + 95) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a postříká se čerstvě připraveným roztokem *hexakyanoželezitanu draselného R* (5 g/l) v *chloridu železitém RS1*. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšuje žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrně zůstávající na startu.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 7,5 % až 11,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *lihu 96% R*, přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* mezi dvěma inflexními body.

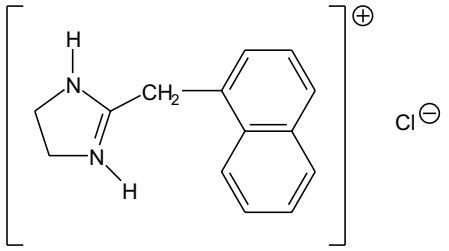
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,38 mg $C_{19}H_{22}ClNO_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

†† Naphazolini hydrochloridum

Nafazoliniumchlorid



$C_{14}H_{15}ClN_2$ M_r 246,74 CAS 550-99-2

Je to 4,5-dihydro-2-(1-naftylmethyl)-2-imidazoliumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{15}ClN_2$.

Taje při asi 259 °C, za rozkladu.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Taje za rozkladu při teplotě asi 259 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 250,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje čtyři absorpční maxima, při 270 nm, 280 nm, 287 nm a 291 nm. Specifická absorbance v maximu při 270 nm je 230 až 245, v maximu při 280 nm je 265 až 290, v maximu při 287 nm je 190 až 200 a v maximu při 291 nm je 180 až 195.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *nafazoliniumchloridu CRL*.

C. Asi 0,5 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R* a přidá se 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) a 0,5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (20 g/l). Nechá se 10 min stát, přidá se 1 ml roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* (80 g/l); vzniká fialové zabarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 20 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,6 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Naftylacetylethylendiamin. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok. 40 mg *nafazoliniumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml *methanolu R* (roztok a). Odděleně se rozpustí 2 mg *naftylacetylethylendiamoniumchloridu CRL* v 10 ml *methanolu R* (roztok b). 0,5 ml roztoku (a) a 0,5 ml roztoku (b) se smíchají.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1,5 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min při 100 °C až 105 °C, postříká se roztokem *ninhydrinu R* (5 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšuje žádná skvrna odpovídající naftylacetylethylendiamoniumchloridu intenzitou odpovídající skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve směsi 50 ml *lihu 96% R* a 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,67 mg $C_{14}H_{15}ClN_2$.

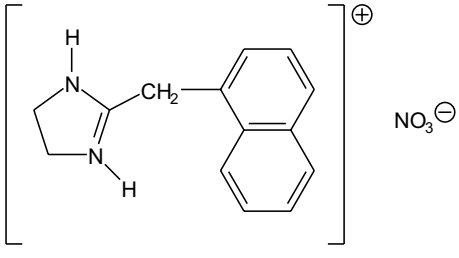
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

†† Naphazolini nitras

Nafazoliniumnitrat

Synonymum. Naphazolinium nitricum



$C_{14}H_{15}N_3O_3$ M_r 273,29 CAS 5144-52-5

Je to 4,5-dihydro-2-(1-naftylmethyl)-2-imidazoliumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{15}N_3O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 167 °C až 170 °C.

B. 50 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 250,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje čtyři absorpční maxima; při 270 nm, 280 nm, 287 nm a 291 nm. Specifická absorbance v maximu při 270 nm je asi 215, v maximu při 280 nm je asi 250, v maximu při 287 nm je asi 175 a v maximu při 291 nm je asi 170.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *nafazoliniumnitratu CRL*.

D. Asi 0,5 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R* a přidá se 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) a 0,5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (20 g/l). Nechá se 10 min stát, přidá 1 ml roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* (80 g/l); vzniká fialové zabarvení.

E. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *vody R,* přidá se 0,2 g *oxidu hořečnatého R* a 30 min se mechanicky třepe. Potom se přidá 10 ml *chloroformu R* a znovu se silně protřepe. Po oddělení vrstev se vodná vrstva zfiltruje a odpaří se do sucha. Zbytek vyhovuje zkoušce na dusičnany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí mírným zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se roztok S.

Naftylacetylethylendiamin. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok. 40 mg *nafazoliniumnitratu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R* (roztok a). Odděleně se rozpustí 2 mg *naftylacetylethylendiamoniumchloridu CRL* v 10 ml *methanolu R* (roztok b). 0,5 ml roztoku (a) a 0,5 ml roztoku (b) se smíchají.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1,5 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min při 100 °C až 105 °C, postříká se roztokem *ninhydrinu R* (5 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající naftylacetylethylendiamoniumchloridu nepřevyšuje intenzitou odpovídající skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy (*2.4.4*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

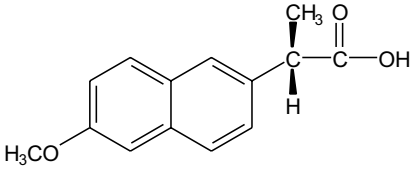
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,33 mg $C_{14}H_{15}N_3O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

† Naproxenum

Naproxen



$C_{14}H_{14}O_3$ M_r 230,26 CAS 22204-53-1

Je to kyselina (*S*)-2-(6-methoxy-2-naftyl)propionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{14}H_{14}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v methanolu, mírně rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, C a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 154 °C až 158 °C.

C. 40,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje čtyři absorpční maxima, při 262 nm, 271 nm, 316 nm a 331 nm. Specifická absorbance v maximu při 262 nm je 216 až 238, v maximu při 271 nm je 219 až 241, v maximu při 316 nm je 61 až 69 a v maximu při 331 nm je 79 až 87.

D. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *naproxenu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

E. 2 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové R;* roztok je žlutý. Přidá se 50 mg *chloralhydrátu R* a třepe se do rozpuštění. Zbarvení roztoku se změní na oranžové a potom na oranžově červené.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +63° až +68,5°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *chloroformu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *tetrahydrofuranu R* a *toluenu R* (3 + 9 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 3 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve směsi 25 ml *vody R* a 75 ml *methanolu R*, přidá se 1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,03 mg $C_{14}H_{14}O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Natrii acetas

Octan sodný

$C_2H_3NaO_2 . 3H_2O$ M_r 136,08 CAS 6131-90-4

M_r bezvodého 82,03

Je to trihydrát octanu sodného. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_2H_3NaO_2$.

Vlastnosti

Bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (b) na octany *(2.3.1)*.

B. 1 ml roztoku S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se na 100 ml stejným rozpouštědlem.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,0; měří se roztok připravený zředěním 5 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Redukující látky. 1,0 g se rozpustí ve 100 ml vroucí *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 ml *manganistanu draselného 0,002 mol/l VS*, promíchá se a opatrně se 5 min vaří; růžové zbarvení úplně nezmizí.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena k výrobě dialyzačních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník.

20 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a upraví se hodnota pH na 6,0 přidáním *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* (asi 10 ml). Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,2 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Připraví se kontrolní roztok za použití směsi 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník a hořčík. Ke 200 ml *vody R* se přidá 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0*, 0,1 g *černě eriochromové T s chloridem sodným R*, 2,0 ml *chloridu zinečnatého 0,05 mol/l VS* a po kapkách se přidává *edetan disodný 0,02 mol/l VS* do změny fialového zbarvení na modré. K tomuto roztoku se přidá 10,0 g zkoušené látky a protřepává se až do rozpuštění. Titruje se *edetanem disodným 0,02 mol/l VS* znovu do modrého zbarvení. Ke změně zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,65 ml *edetanu disodného 0,02 mol/l VS* (50 μg/g, počítáno jako Ca).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 39,0 % až 40,5 %; 1,000 g se vloží do neohřáté sušárny a potom se suší při 130 °C.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 5 ml *acetanhydridu R*, zamíchá se a nechá 30 min stát. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,3 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru až do zeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,20 mg $C_2H_3NaO_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro výrobu dialyzačních roztoků.

Natrii alginas

Sodná sůl kyseliny alginové

CAS 9005-38-3

Je to převážně sodná sůl kyseliny alginové, která je směsí polyuronových kyselin $(C_6H_8O_6)_n$ tvořených zbytky kyseliny D-mannuronové a kyseliny L-guluronové. Látka se získává především z řas rodu *Phaeophyceae.*

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutohnědý prášek. Je pomalu rozpustná ve vodě za tvorby viskózního koloidního roztoku, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 0,2 g se rozpustí protřepáváním ve 20 ml *vody R*. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *chloridu vápenatého RS;* vznikne objemná rosolovitá hmota.

B. K 10 ml roztoku ze zkoušky A se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS;* vznikne rosolovitá hmota.

C. K 5 mg se přidá 5 ml *vody R*, 1 ml čerstvě připraveného roztoku *1,3-dihydroxynaftalenu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Roztok se 3 min vaří, ochladí se, přidá se 5 ml *vody R* a protřepe se s 15 ml *diisopropyletheru R*. Současně se provede slepá zkouška. Horní vrstva je intenzivněji modročerveně zbarvená než vrstva získaná při slepé zkoušce.

D. Vyhovuje zkoušce Síranový popel, viz Zkoušky na čistotu. Zbytek z této zkoušky se rozpustí ve 2 ml *vody R;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,10 g se za stálého míchání rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 30 ml a nechá se 1 h stát.

Vzhled roztoku. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji, než je intenzita 6 porovnávacího roztoku nejpodobnější barvy (*2.2.2, Metoda II*).

Chloridy. Nejvýše 1,0 %. Ke 2,50 g se přidá 50 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 1 h se protřepává a zředí se *kyselinou dusičnou zředěnou RS* na 100,0 ml. Zfiltruje se a k 50,0 ml filtrátu se přidá 10,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 5 ml *toluenu R*. Přidají se 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátor a titruje se za silného protřepávání ke konci titrace *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,545 mg Cl.

Vápník. Nejvýše 1,5 %; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v 50 ml *amoniaku zředěného RS2* zahřátím na vodní lázni. Nechá se zchladnout a zředí se *vodou destilovanou R* na 100,0 ml (roztok a). 3,0 ml roztoku (a) se zředí *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.

Porovnávací roztoky. Připraví se tři porovnávací roztoky stejným způsobem jako zkoušený roztok, ale ke 3,0 ml roztoku (a) se přidá 0,75 ml, 1,0 ml a 1,5 ml základního *roztoku vápníku (100 μg Ca/ml) R*.

Nulová poloha přístroje se nastaví za použití směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *vody destilované R* (1,5 + 98,5). Měří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Těžké kovy. S 1,0 g se smíchá 0,5 g *oxidu hořečnatého R1* a žíhá se do temně červeného žáru, dokud nevznikne stejnorodá bílá nebo šedavá hmota. Jestliže po 30 min žíhání zůstává směs zbarvená, ochladí se, zamíchá se skleněnou tyčinkou a žíhání se opakuje. Je-li třeba, postup se opakuje. Směs se žíhá asi 1 h při 800 °C. Zbytek se dvakrát vylouží 5 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*.

Tento roztok se třepe 2 min s 25 ml *isobutylmethylketonu R*. Po oddělení vrstev se spodní vrstva odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. Je-li třeba, zfiltruje se. Ke 12 ml získaného roztoku se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a promíchá se. Přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R* a ihned se promíchá.

Za 2 min není případně vzniklé hnědé zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně následujícím způsobem. K 0,5 g *oxidu hořečnatého R1* se přidají 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*. Vysuší se v sušárně při 100 °C až 105 °C. Stejným způsobem, jak je předepsáno výše, se vyžíhává, vylouží *kyselinou chlorovodíkovou R*, vytřepe *isobutylmethylketonem R*, oddělí a spodní vrstva se odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové R* a zředí se *vodou R* na 20 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml roztoku získaného se zkoušenou látkou a 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a promíchá se. Přidá se 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového* a ihned se promíchá (20 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %; 0,1000 g se 4 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). 30,0 % až 36,0 %, počítáno na vysušenou látku. Stanoví se s 0,1000 g zkoušené látky.

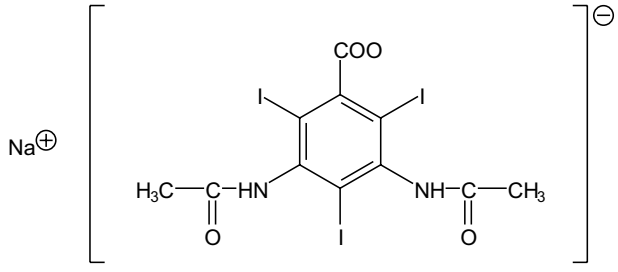
Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* (*2.6.13*).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Natrii amidotrizoas

Sodná sůl kyseliny amidotrizoové



$C_{11}H_8I_3N_2NaO_4$ M_r 635,90 CAS 737-31-5

Je to sodná sůl kyseliny 3,5-bis(acetamido)-2,4,6-trijodbenzoové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_8I_3N_2NaO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v acetonu.

Taje při asi 261 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli kyseliny amidotrizoové CRL*. Zkouší se látky sušené 3 h při 100 °C až 105 °C.

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

C. 50 mg se mírně zahřeje v malé porcelánové misce nad otevřeným plamenem; vyvíjejí se fialové páry.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Roztoky se připravují za tlumeného světla a při vyvíjení se chromatogramy chrání před světlem.*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v roztoku *amoniaku R* 3% *(V/V)* v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí 3% *(V/V)* roztokem *amoniaku 17,5% R* v *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí 3% *(V/V)* roztokem *amoniaku 17,5% R* v *methanolu R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *sodné soli kyseliny amidotrizoové CRL* se rozpustí v 3% (*V/V*) roztoku *amoniaku 17,5% R* v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, 2-butanonu R a toluenu R* (20 + 25 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší do vytěkání rozpouštědel a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %).

Volné aromatické aminy. *Roztoky a zkoumadla se udržují ve vodě s ledem chráněny před světlem.* 0,50 g se naváží do odměrné baňky na 50 ml, přidá se 15 ml *vody R*, protřepe se, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a ochladí se ve vodě s ledem. Ke směsi se přidá 5 ml čerstvě připraveného roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l) a 12 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Opatrně se protřepe a nechá se stát přesně 2 min po přidání kyseliny chlorovodíkové. Potom se přidá 10 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l). Nechá se stát 5 min za častého protřepání, pak se přidá 0,15 ml roztoku *1-naftolu R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, protřepe se a nechá se stát dalších 5 min. Potom se přidá 3,5 ml *tlumivého roztoku o pH 10,9*, promíchá se a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Absorbance roztoku *(2.2.25)* při 485 nm měřená do 20 min po přípravě proti kontrolní tekutině připravené současně za stejných podmínek bez zkoušené látky je nejvýše 0,30.

Volný jod a jodidy. Nejvýše 50 μg/g. 1,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 10 ml. Po kapkách se přidává *kyselina dusičná zředěná RS*, dokud vzniká sraženina, a navíc se přidají 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Směs se zfiltruje, sraženina se promyje 5 ml *vody R*. Ke spojenému filtrátu s promývací tekutinou se přidá 1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R*, 1 ml *dichlormethanu R* a protřepe se. Spodní vrstva není intenzivněji zbarvena než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití směsi 5 ml základního *roztoku jodu (10 μg I/ml)*, 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 15 ml *vody R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 11,0 %; stanoví se s 0,400 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

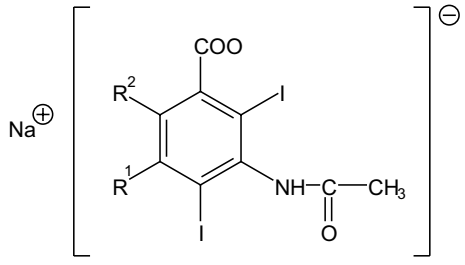
K 0,150 g ve varné baňce na 250 ml se přidá 5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, 20 ml *vody R*, 1 g *zinku práškového R* a několik varných kuliček. Směs se vaří 30 min pod zpětným chladičem, pak se ochladí a chladič se promyje 20 ml *vody R*, které se přidají do baňky. Obsah baňky se zfiltruje, filtr se promyje několikrát *vodou R*. Ke spojenému filtrátu s promývací tekutinou se přidá 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a ihned se titruje *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* a použití vhodného systému elektrod, např. stříbrná-merkurosulfatová elektroda.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,20 mg $C_{11}H_8I_3N_2NaO_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

Nečistoty

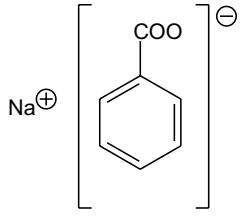


A. $R^1 = NH_2$; $R^2 = I$: natrium-3-acetamido-5-amino-2,4,6-trijodbenzoat,
B. $R^1 = NHCOCH_3$; $R^2 = H$: natrium-3,5-bis(acetamido)-2,4-dijodbenzoat.

Natrii benzoas

Benzoan sodný

Synonymum. Natrium benzoicum



$C_7H_5NaO_2$ M_r 144,11 CAS 532-32-1

Je to sodná sůl kyseliny benzoové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_7H_5NaO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický nebo zrnitý prášek nebo vločky. Je slabě hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 90% *(V/V)*.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám (b) a (c) na benzoany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,2 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* nebo 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*.

Halogenované sloučeniny. *Všechny skleněné nádoby použité v této zkoušce musí být prosty chloridů. Připraví se namočením do roztoku kyseliny dusičné R (500 g/l) přes noc a opláchnutím vodou. Uchovávají se naplněné vodou a doporučuje se, aby tyto nádoby byly používány pouze pro tuto zkoušku.*

K 20,0 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 50,0 ml (zkoušený roztok).

Stanovení ionizovaného chloru. Do tří odměrných baněk na 25 ml se připraví následující roztoky.

Roztok (a). Ke 4,0 ml zkoušeného roztoku se přidají 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 3 ml *lihu 96% R*. Tento roztok se použije k přípravě roztoku *A*.
Roztok (b). Ke 3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* se přidají 2 ml *vody R* a 5 ml *lihu 96% R*. Tento roztok se použije k přípravě roztoku *B*.
Roztok (c). Ke 4,0 ml základního *roztoku chloridu (8 μg Cl/ml)* se přidá 6,0 ml *vody R*. Tento roztok se použije k přípravě roztoku *C*.

Do čtvrté odměrné baňky na 25 ml se převede 10 ml *vody R*. Do každé baňky se přidá 5 ml *síranu amonno-železitého RS5*, promíchá se a po kapkách za míchání se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 5 ml *thiokyanatanu rtuťnatého RS*. Obsah baněk se protřepe, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a nechá se stát 15 min ve vodní lázni při 20 °C. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 460 nm ve 2cm kyvetách roztoku *A* proti roztoku *B* jako kontrolní tekutině a absorbance roztoku *C* proti roztoku připravenému za použití 10 ml *vody R* (čtvrtá odměrná baňka) jako kontrolní tekutině. Absorbance roztoku *A* není větší než absorbance roztoku *C* (200 μg/g).

Stanovení celkového chloru

Roztok (a). K 10,0 ml zkoušeného roztoku se přidá 7,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,125 g *niklu Raneyova R* a zahřívá se 10 min na vodní lázni. Směs se po ochlazení na pokojovou teplotu zfiltruje do odměrné baňky na 25 ml a filtr se promyje třikrát 2 ml *lihu 96% R* (může vzniknout jemná sraženina, která po okyselení zmizí). Filtrát a promývací tekutina se zředí *vodou R* na 25,0 ml. Tento roztok se použije k přípravě roztoku *A*.
Roztok (b). Současně se stejným způsobem připraví roztok, který místo zkoušeného roztoku obsahuje 5 ml *lihu 96% R* a 5 ml *vody R*. Tento roztok se použije k přípravě roztoku *B*.
Roztok (c). K 6,0 ml základního *roztoku chloridu (8 μg Cl/ml)* se přidají 4,0 ml *vody R*. Tento roztok se použije k přípravě roztoku *C*.

Do čtyř odměrných baněk na 25 ml se odděleně převede 10 ml roztoku (a), 10 ml roztoku (b), 10 ml roztoku (c) a 10 ml *vody R*. Do každé baňky se přidá 5 ml *síranu amonno-železitého RS5*, promíchá se a po kapkách za míchání se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 5 ml *thiokyanatanu rtuťnatého RS*. Obsah baněk se protřepe, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a nechá se stát 15 min ve vodní lázni při 20 °C. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 460 nm ve 2cm kyvetách roztoku *A* proti

roztoku *B* jako kontrolní tekutině a absorbance roztoku *C* proti roztoku připravenému za použití 10 ml *vody R* (čtvrtá odměrná baňka) jako kontrolní tekutině. Absorbance roztoku *A* není větší než absorbance roztoku *C* (300 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím na 50 °C, ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, ochladí se, přidá se 0,05 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,41 mg $C_7H_5NaO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii bromidum

Bromid sodný

Synonymum. Natrium bromatum

NaBr M_r 102,89 CAS 7647-15-6

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny NaBr.

Vlastnosti

Bílý zrnitý prášek nebo malé bezbarvé průsvitné nebo neprůhledné krystaly. Je slabě hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na bromidy *(2.3.1)*.

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Bromičnany. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *škrobu RS*, 0,1 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l), 0,25 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l VS* a nechá se 5 min stát chráněn před světlem; nevznikne modré nebo fialové zbarvení.

Chloridy. 1,000 g se v kuželové baňce rozpustí ve 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Přidá se 5 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a zahřívá se na vodní lázni do úplného odbarvení roztoku. Stěny baňky se opláchnou malým množstvím *vody R* a roztok se zahřívá 15 min na vodní lázni. Po ochlazení se roztok zředí *vodou R* na 50 ml, přidá se 5,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 1 ml *dibutylftalatu R*. Protřepe se a titruje *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 5 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru. Spotřeba *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* je nejvýše 1,7 ml (0,6 %). Tato spotřeba se zaznamená pro Stanovení obsahu.

Jodidy. K 5 ml roztoku S se přidá 0,15 ml *chloridu železitého RS1*, 2 ml *chloroformu R*, protřepe se a nechají se oddělit vrstvy; chloroformová vrstva je bezbarvá *(2.2.2, Metoda I)*.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Baryum. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody destilované R* a 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Po 15 min není opalescence tohoto roztoku intenzivnější než opalescence směsi 5 ml roztoku S a 6 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Hořčík a kovy alkalických zemin *(2.4.7)*. 10,0 g vyhovuje limitní zkoušce na hořčík a kovy alkalických zemin. Spotřeba *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* není vyšší než 5,0 ml (200 μg/g, počítáno jako Ca).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 50 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R*. Protřepe se a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru a za silného protřepávání v blízkosti konečného bodu. Odečte se spotřeba zjištěná ve zkoušce Chloridy.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,29 mg NaBr.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Natrii calcii edetas

Edetan sodno-vápenatý

Synonymum. Natrium calcium edeticum

$C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8 . nH_2O$ M_r bezvodého 374,27 CAS 23411-34-9

Je to ethylendiamintetraacetatovápenatan disodný. Obsahuje proměnlivé množství krystalické vody. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *edetanu sodno-vápenatého CRL*.

B. 2 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 6 ml *dusičnanu olovnatého RS*, protřepe se a potom se přidají 3 ml *jodidu draselného RS;* nevznikne žlutá sraženina. Roztok se zalkalizuje na *papír lakmusový červený R* přidáním *amoniaku zředěného RS2* a přidají se 3 ml *šťavelanu amonného RS;* vznikne bílá sraženina.

C. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, roztok se zalkalizuje na *papír lakmusový červený R* přidáním *amoniaku zředěného RS2* a přidají se 3 ml *šťavelanu amonného RS;* vznikne nejvýše nepatrná sraženina.

D. Žíhá se; zbytek vyhovuje zkouškám na vápník *(2.3.1)*.

E. Zbytek získaný ve zkoušce D vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,5 až 8,0. Měří se následující roztok: 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Edetan disodný. 5,0 g se rozpustí v 250 ml *vody R,* přidá se 10 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 10,0* a asi 50 mg *černě eriochromové T s chloridem sodným R*. Ke změně zbarvení indikátoru na fialové se použije nejvýše 1,5 ml *chloridu hořečnatého 0,1 mol/l VS* (1,0 %).

Chloridy *(2.4.4)*. K 20 ml roztoku S se přidá 30 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, nechá se 30 min stát a zfiltruje se. 2,5 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (80 μg/g). Před přidáním *kyseliny thioglykolové R* se ke každému roztoku přidá 0,25 g *chloridu vápenatého R*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 5,0 % až 13,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky (Metoda B).

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 300 ml. Přidají se 2 g *methenaminu R*, 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a titruje se *dusičnanem olovnatým 0,1 mol/l VS* za použití asi 50 mg *oranže xylenolové s dusičnanem draselným R* jako indikátoru.

1 ml *dusičnanu olovnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,43 mg $C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Natrii carbonas

Uhličitan sodný

Synonymum. Natrii carbonas anhydricus

Na_2CO_3 M_r 105,99 CAS 497-19-8

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,5 % až 100,5 % sloučeniny Na_2CO_3.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý slabě zrnitý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml; roztok je silně zásaditý *(2.2.4)*.

B. Roztok připravený ve zkoušce A vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

C. Roztok připravený ve zkoušce A vyhovuje zkoušce (a) na na sodík *(2.3.1)*.

D. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí po částech ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 25 ml *vody destilované R*. Roztok se zahřeje k varu a ochladí se. Přidá se tolik *hydroxidu sodného zředěného RS*, aby měl roztok neutrální reakci, a potom se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než barevný porovnávací roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Alkalické hydroxidy a hydrogenuhličitany. 0,4 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 20 ml *chloridu barnatého RS1* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*; roztok nezčervená. Zbytek filtrátu se 2 min vaří; roztok zůstane čirý *(2.2.1)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,4 g se rozpustí ve *vodě R*, přidají se 4 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (125 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (250 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší při 300 °C.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na červené.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 52,99 mg Na_2CO_3.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Natrii carbonas decahydricus

Dekahydrát uhličitanu sodného

$Na_2CO_3 . 10H_2O$ M_r 286,14 CAS 6132-02-1

M_r bezvodého 105,99

Obsahuje 36,7 % až 40,0 % sloučeniny Na_2CO_3.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé průsvitné zvětrávající krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml; roztok je silně zásaditý *(2.2.4)*.

B. Roztok připravený ve zkoušce A vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

C. Roztok připravený ve zkoušce A vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí po částech ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 25 ml *vody destilované R*. Roztok se zahřeje k varu a ochladí se. Přidá se tolik *hydroxidu sodného zředěného RS*, aby měl roztok neutrální reakci, a potom se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. 4,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Alkalické hydroxidy a hydrogenuhličitany. 1,0 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 20 ml *chloridu barnatého RS1* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok nezčervená. Zbytek filtrátu se 2 min vaří; roztok zůstane čirý *(2.2.1)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 1,0 g se rozpustí ve vodě, přidají se 4 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 52,99 mg Na_2CO_3.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Natrii carbonas monohydricus

Monohydrát uhličitanu sodného

$Na_2CO_3 . H_2O$ M_r 124,00 CAS 5968-11-6

M_r bezvodého 105,99

Obsahuje 83,0 % až 87,5 % sloučeniny Na_2CO_3.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml; roztok je silně zásaditý *(2.2.4)*.

B. Roztok připravený ve zkoušce A vyhovuje zkoušce na uhličitany *(2.3.1)*.

C. Roztok připravený ve zkoušce A vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí po částech ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 25 ml *vody destilované R*. Roztok se zahřeje k varu a ochladí se. Přidá se tolik *hydroxidu sodného zředěného RS*, aby měl roztok neutrální reakci, a potom se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Tento roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Alkalické hydroxidy a hydrogenuhličitany. 0,4 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidá se 20 ml *chloridu barnatého RS1* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok nezčervená. Zbytek filtrátu se 2 min vaří; roztok zůstane čirý *(2.2.1)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,4 g se rozpustí ve *vodě R*, přidají se 4 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (125 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (250 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (50 μg/g).

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 52,99 mg Na_2CO_3.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Natrii cetylo- et stearylosulfas

Cetylstearylsíran sodný

CAS 59186-41-3

Je to směs cetylsíranu sodného ($C_{16}H_{33}NaO_4S$; M_r 344,48) a stearylsíranu sodného ($C_{18}H_{37}NaO_4S$; M_r 372,54). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje nejméně 90,0 % cetylstearylsíranu sodného a nejméně 40 % cetylsíranu sodného.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý amorfní nebo krystalický prášek, rozpuštěním v horké vodě vzniká opalizující roztok. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě, částečně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, D a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 10 ml *lihu* 70% (*V/V*).
Porovnávací roztok. 50 mg *cetylstearylsíranu sodného CRL* se rozpustí na vodní lázni v 10 ml *lihu* 70% (*V/V*).

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *acetonu R* a *methanolu R* (20 + 40 + 40) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (50 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá se 25 min při 120 °C. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční časy dvou hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (c) jsou shodné s retenčními časy dvou hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a protřepe se; vytvoří se pěna.

D. Zkoušená látka barví nesvítivý plamen žlutě.

E. K 0,1 ml roztoku připraveného ve zkoušce C se přidá 0,1 ml roztoku *modři methylenové R* (1 g/l), 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 2 ml *dichlormethanu R* a zatřepe se; dichlormethanová vrstva se zbarví intenzivně modře.

F. Asi 10 mg se smíchá s 10 ml *ethanolu R*, za častého protřepávání se zahřeje na vodní lázni k varu, ihned se zfiltruje a odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v 7 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a roztok se odpaří na poloviční objem. Po vychladnutí se zfiltruje. K filtrátu se přidá 1 ml *chloridu barnatého RS1*; vznikne bílá krystalická sraženina.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,5 g se zahříváním rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 15 ml *lihu R* 90% (*V/V*). Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS1*; roztok je bezbarvý. Přidá se 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*; roztok je červený.

Chlorid sodný a síran sodný. Nejvýše 8,0 %.

Chlorid sodný. 5,00 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, po kapkách se přidává *kyselina dusičná zředěná RS* do neutrální reakce na *papír lakmusový modrý R*, přidají se 2 ml *chromanu draselného RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,844 mg NaCl.

Síran sodný. 0,500 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve 20 ml *vody R*, přidá se 1 ml roztoku *dithizonu R* (0,5 g/l) v *acetonu R*. Pokud je roztok červený, přidává se po kapkách *kyselina dusičná 1 mol/l VS*, dokud se roztok nezbarví modrozeleně. Přidají se 2,0 ml *kyseliny dichlorocto*

vé RS a 80 ml *acetonu R*. Titruje se *dusičnanem olovnatým 0,01 mol/l VS* do stálého oranžovočerveného zbarvení.

1 ml *dusičnanu olovnatého 0,01 mol/l VS* odpovídá 1,420 mg Na_2SO_4.

Volný cetostearylalkohol. Nejvýše 4 %; hodnotí se chromatogram zkoušeného roztoku (a), viz Stanovení obsahu.

Obsah volného cetylstearylalkoholu v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$S\frac{100 \cdot m_H}{S_{Ha(corr)} \cdot m},$$

v němž značí:

S - součet ploch píků cetylalkoholu a stearylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

m_H - hmotnost přidaného vnitřního standardu ve zkoušeném roztoku (a) v miligramech,

$S_{Ha(corr)}$ - korigovaná plocha píku vnitřního standardu chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

m - hmotnost cetylstearylsíranu sodného použitého při přípravě zkoušeného roztoku (a) v miligramech.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 0,20 g *heptadekanolu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 50 ml.

Zkoušený roztok (a). 0,300 g se rozpustí v 50 ml *ethanolu R*, přidají se 2 ml roztoku vnitřního standardu a 48 ml *vody R*. Čtyřikrát se protřepe 25 ml *pentanu R* a přidá se *chlorid sodný R*, pokud je to nezbytné k usnadnění oddělení vrstev. Organické vrstvy se spojí a vodně-lihová vrstva se uschová pro přípravu zkoušených roztoků (c) a (d). Organická vrstva se dvakrát promyje 30 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se.

Zkoušený roztok (b). 0,300 g se rozpustí v 50 ml *ethanolu R* a přidá se 50 ml *vody R*. Čtyřikrát se protřepe 25 ml *pentanu R* a přidá se *chlorid sodný R*, pokud je to nezbytné k usnadnění oddělení vrstev. Spojené organické vrstvy se promyjí dvakrát 30 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Zkoušený roztok (c). 25 ml vodně-lihové vrstvy získané při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převede do 200ml baňky, ke které lze připojit zpětný chladič. Přidá se 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 10 ml roztoku vnitřního standardu a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Po vychladnutí se protřepe čtyřikrát 20 ml *pentanu R*. Spojené organické vrstvy se promyjí dvakrát 20 ml *vody R,* vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Zkoušený roztok (d). 25 ml vodně-lihové vrstvy získané při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převede do 200ml baňky, ke které lze připojit zpětný chladič. Přidá se 20 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 10 ml *ethanolu R* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Po vychladnutí se protřepe čtyřikrát 20 ml *pentanu R*. Spojené organické vrstvy se promyjí dvakrát 20 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se.

Porovnávací roztok. 50 mg *cetylalkoholu CRL* a 50 mg *stearylalkoholu CRL* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Chromatografický postup se provádí za použití:
- kapilární kolony z křemenného skla délky 25 m a vnitřního průměru 0,25 mm naplněné *polydimethylsiloxanem R* nebo jinou vhodnou polární fází,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- dělicího poměru 1 : 100.

Teplota kolony při nástřiku je 150 °C, pak se zvyšuje rychlostí 5 °C/min až na 250 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je 250 °C.

Látky se elují v následujícím pořadí: cetylalkohol, heptadekanol (vnitřní standard) a stearylalkohol.

Korekce interference. Odděleně se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku (a) a 1 μl zkoušeného roztoku (b). Pokud na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je pík při stejném retenčním čase jako pík vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), vypočítá se poměr podle vzorce:

$$r = \frac{S_{ci}}{S_i},$$

v němž značí:

S_{ci} - plochu píku cetylalkoholu na chromatogranu zkoušeného roztoku (b),

S_i - plochu píku se stejným retenčním časem jako pík vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Pokud je r menší než 300, počítá se korigovaná plocha $S_{Ha(corr)}$ píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) podle vzorce:

$$S_{Ha(Corr)} = S'_{Ha} - \frac{S_i \cdot S_c}{S_{ci}},$$

v němž značí:

S'_{Ha} - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

S_c - plochu píku cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Odděleně se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku (c) a 1 μl zkoušeného roztoku (d). Provede se korekce interference stejným způsobem jako pro zkoušený roztok (a) a počítá se korigovaná plocha $S_{Hc(Corr)}$ píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (c).

Odděleně se nastříknou stejné objemy porovnávacího roztoku, zkoušeného roztoku (c) a zkoušeného roztoku (d). Porovnají se retenční časy píků na chromatogramech zkoušených roztoků s retenčními časy píků na chromatogramu porovnávacího roztoku a stanoví se plochy jednotlivých píků.

Vypočítá se obsah cetylsíranu sodného ve zkoušené látce v procentech podle vzorce:

$$\frac{(A \cdot 1{,}421) \cdot m'_H \cdot 100}{S_{Hc(Corr)} \cdot m'},$$

v němž značí:

A - plochu píku cetylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (c),

m'_H - navážku přidaného vnitřního standardu ve zkoušeném roztoku (c) v miligramech,

$S_{Hc(Corr)}$ - korigovanou plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku (c),

m' - navážku zkoušené látky ve zkoušeném roztoku (c) v miligramech.

Obsah stearylsíranu sodného ve zkoušené látce v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{(B \,.\, 1{,}377) \,.\, m'_{\mathrm{H}} \,.\, 100}{S_{\mathrm{Hc(Corr)}} \,.\, m'},$$

v němž značí:

B - plochu píku stearylalkoholu na chromatogramu zkoušeného roztoku (c).

Obsah cetylstearylsíranu sodného v procentech odpovídá součtu obsahů cetylsíranu sodného a stearylsíranu sodného v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii chloridum

Chlorid sodný

Synonymum. Natrium chloratum

NaCl M_r 58,44 CAS 7647-14-5

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny NaCl.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na chloridy *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 20,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 20 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Bromidy. K 1,0 ml roztoku S se přidají 4,0 ml *vody R*, 2,0 ml *červeně fenolové RS2*, 1,0 ml roztoku *chloraminu T R* (0,1 g/l) a okamžitě se zamíchá. Přesně za 2 min se přidá 0,15 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l RS*, zamíchá se a zředí *vodou R* na 10,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* roztoku měřená při 590 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny není větší než absorbance

porovnávacího roztoku připraveného současně stejným postupem za použití 5,0 ml roztoku *bromidu draselného R* (3,0 mg/l) (50 μg/g).

Kyanoželeznatany. 2,0 g se rozpustí v 6 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml směsi připravené za použití 5 ml roztoku *síranu amonno-železitého R* (10 g/l) v roztoku *kyseliny sírové R* (2,5 g/l) a 95 ml roztoku *síranu železnatého R* (10 g/l). Do 10 min nevznikne modré zbarvení.

Jodidy. 5 g se po kapkách navlhčí čerstvě připravenou směsí 0,15 ml *dusitanu sodného RS*, 2 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS*, 25 ml *škrobu prostého jodidů RS* a 25 ml *vody R*. Po 5 min stání se pozoruje v denním světle; směs nevykazuje modré zbarvení.

Dusitany. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody R*. Absorbance *(2.2.25)* roztoku měřená při 354 nm není větší než 0,01.

Fosforečnany *(2.4.11)*. 2 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 100 ml vyhovují limitní zkoušce na fosforečnany (25 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 30 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Hliník *(2.4.17)*. Pokud je látka určena k výrobě roztoků pro peritoneální dialýzu, hemodialyzačních roztoků nebo hemofiltračních roztoků, vyhovuje následující zkoušce na hliník.

20,0 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidá se 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,2 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. K přípravě kontrolního roztoku se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (1 μg/g).

Baryum. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody destilované R* a 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Tento roztok za 2 h neopalizuje intenzivněji než směs 5 ml roztoku S a 7 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (2 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije směs 4 ml základního *roztoku železa (1 μg Fe/ml)* a 6 ml *vody R*.

Hořčík a kovy alkalických zemin *(2.4.7)*. 10,0 g vyhovuje limitní zkoušce na hořčík a kovy alkalických zemin. Spotřeba *edetanu disodného 0,01 mol/l VS* je nejvýše 2,5 ml (100 μg/g, počítáno jako Ca).

Draslík. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků nebo hemodialyzačních roztoků, hemofiltračních roztoků, roztoků pro peritoneální dialýzu, obsahuje nejvýše 500 μg K/g; stanoví se atomovou emisní spektrometrií *(2.2.22, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. 1,144 g *chloridu draselného R* předem sušeného 3 h při 100 °C až 105 °C se rozpustí ve *vodě R,* zředí se jí na 1000,0 ml (600 μg K/ml) a dále se zředí dle potřeby.

Měří se emisní intenzita při 768 nm.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 5 m.j. endotoxinu v gramu.

Stanovení obsahu

1,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 50 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 2 ml *dibutylftalatu R* a protřepe se. Titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru. V blízkosti bodu ekvivalence se intenzivně protřepává.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,844 mg NaCl.

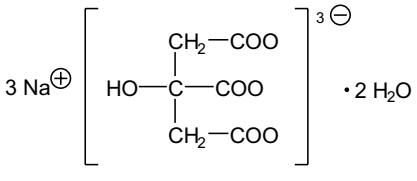
Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů,
- zda je látka vhodná pro výrobu roztoků pro peritoneální dialýzu, hemodialyzačních roztoků nebo hemofiltračních roztoků.

Natrii citras dihydricus

Dihydrát citronanu sodného

Synonyma. Natrii citras, Natrium citricum



$C_6H_5Na_3O_7 . 2H_2O$ M_r 294,10 CAS 6132-04-3

M_r bezvodého 258,07

Je to dihydrát sodné soli kyseliny 2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_5Na_3O_7$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bílé zrnité krystaly, na vlhkém vzduchu slabě vlhne. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 4 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce na citronany *(2.3.1)*.

B. 1 ml roztoku S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Snadno zuhelnitelné látky. K 0,20 g upráškované látky se přidá 10 ml *kyseliny sírové R*, 60 min se zahřívá ve vodní lázni při (90 ± 1) °C a rychle se ochladí. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_2$ nebo $ZŽ_2$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Šťavelany. 0,50 g se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 1 g granulovaného *zinku R*, 1 min se zahřívá na vodní lázni a potom se 2 min nechá stát. Tekutina se slije do zkumavky obsahující 0,25 ml roztoku *fenylhydraziniumchloridu R* (10 g/l) a zahřeje se k varu. Rychle se ochladí a převede se do odměrného válce a přidá se stejný objem *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,25 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*. Protřepe se a 30 min se nechá stát. Růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než současně stejným způsobem připravený porovnávací roztok obsahující 4 ml roztoku *kyseliny šťavelové R* (50 mg/l) (300 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 11,0 % až 13,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky. Po přidání látky se směs před titrací 15 min míchá.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Pokud je látka určena k výrobě velkoobjemných parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne nitrožilně 10 ml čerstvě připraveného roztoku ve *vodě na injekci R* obsahujícího v mililitru 10 mg zkoušené látky a 7,5 mg *chloridu vápenatého R* prostého pyrogenních látek.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v *kyselině octové bezvodé R* zahřátím na teplotu asi 50 °C a ochladí se. Přidá se 0,25 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátor a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení.

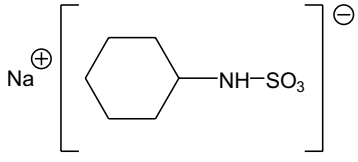
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,602 mg $C_6H_5Na_3O_7$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Natrii cyclamas

Cyklamát sodný



$C_6H_{12}NNaO_3S$ M_r 201,22 CAS 139-05-9

Je to sodná sůl kyseliny N-cyklohexylsulfamové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{12}NNaO_3S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *cyklamátu sodného CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Kyselina amidosírová, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *vody R*, 2 ml *dusičnanu stříbrného RS1* a protřepe se; vznikne bílá krystalická sraženina.

D. K 1 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R,* 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 4 ml *chloridu barnatého RS1* a promíchá se; roztok je čirý. Přidají se 2 ml *dusitanu sodného RS;* vznikne objemná bílá sraženina a uniká plyn.

E. Směs 1 ml roztoku S a 1 ml *vody R* vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3).* 5,5 až 7,5; měří se roztok S.

Absorbance *(2.2.25).* Absorbance roztoku S měřená při 270 nm není větší než 0,10.

Kyselina amidosírová. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). Použije se roztok S.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *cyklamátu sodného CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kyseliny amidosírové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, amoniaku 26% R, ethylacetatu R* a *propanolu R* (10 + 10 + 20 + 70) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, zahřívá se 5 min při 105 °C a ještě horká se postříká *chlornanem sodným RS* zředěným na obsah aktivního chloru (5 g/l). Suší se v proudu studeného vzduchu, až se vrstva pod nanesenými body barví nejvýše slabě modře kapkou *škrobu s jodidem draselným RS;* dbá se, aby nedošlo k prodlouženému působení studeného vzduchu. Potom se postříká *škrobem s jodidem draselným RS* a do 5 min se hodnotí chromatogramy. Žádná skvrna odpovídající kyselině amidosírové na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Anilin, cyklohexylamin a dicyklohexylamin. Nejvýše 1 µg/g anilinu, 10 µg/g cyklohexylaminu a 1 µg/g dicyklohexylaminu. Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *tetradekanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 3,0 mg (asi 4 µl) *tetradekanu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 2,00 g se rozpustí ve 100ml kuželové baňce se zabroušenou zátkou v 18 ml *vody R* pomocí magnetické míchačky. Hodnota pH roztoku se upraví asi na 11 přidáním 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného R*, přidá se 30,0 ml *toluenu R*, baňka se uzavře a míchá se 2 min na magnetické míchačce. Roztok se převede do vhodné zkumavky a odstřeďuje se 3 min při asi 4000 ot/min. 20,0 ml supernatantní čiré tekutiny se převede do 25ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou obsahující 4,0 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové zředěné R* a *vody R* a také magnetické míchadlo. Baňka se uzavře a míchá se 2 min, obsah (bez magnetického míchadla) se převede do vhodné zkumavky a odstřeďuje se 2 min při asi 4000 ot/min. 3,6 ml spodní vodné vrstvy se opatrně odsaje pipetou a převede do malé zkumavky opatřené vhodným uzávěrem a obsahující 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného R* a 200 µl roztoku vnitřního standardu. Dbá se, aby se nepřenesly kapky toluenu. Silně se třepe 2 min a krátce se odstředí při 2000 ot/min. Spodní vrstva, jež je určena pro chromatografii, se pomocí injekční stříkačky přemístí do malé nádobky s uzávěrem k opakovanému odběru.
Porovnávací roztok. 10 mg (asi 12 µl) *cyklohexylaminu R*, 1,0 mg (asi 1,1 µl) *dicyklohexylaminu R* a 1,0 mg (asi 1 µl) *anilinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml (roztok (a)). Dále se pracuje s 20,0 ml roztoku (a) (obsahujícího 20 µg cyklohexylaminu, 2 µg dicyklohexylaminu a 2 µg anilinu) tak, jak je výše uvedeno u zkoušeného roztoku, počínaje slovy "pH roztoku se upraví asi na 11..."

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony 1,8 m dlouhé a o vnitřním průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou 9 % *makrogolu 20 000 R* a 1 % *hydroxidu draselného R*. Použije se kolona, na které se 18 hod ustavovala rovnováha dusíkem při 180 °C. Impregnace se může provést takto: 1,8 g *makrogolu 20 000 R* se rozpustí v 60 ml *chloroformu R* a roztok se přidá k 18,2 g *křemeliny pro plynovou chromatografii R*. Nechá se stát 1 h a vysuší se do sucha na rotační vakuové odparce při 40 °C. 0,2 g *hydroxidu draselného R* se rozpustí v 60 ml

methanolu R a roztok se přidá k impregnované křemelině pro plynovou chromatografii, vysuší se do sucha při nejnižší možné teplotě,
- *dusíku pro plynovou chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 75 °C, teplota nástřikového prostoru na 150 °C a teplota detektoru na 180 °C. Nastříknou se roztoky a po 1 min se zvyšuje teplota kolony rychlostí 8 °C/min až na 175 °C, při níž se udržuje 5 min. Ověří se kvalita stacionární fáze, použitých zkoumadel a rozpouštědel tak, že se nastříkne kontrolní roztok připravený jako zkoušený roztok, v němž místo v roztoku cyklamátu sodného bylo použito 20 ml *vody R*. Jestliže jsou na chromatogramu cizí píky, které mohou rušit, nebo jiné odchylky, použijí se zkoumadla vhodnější kvality. Nastříkne se 1,5 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Látky se eluují v pořadí: cyklohexylamin, tetradekan (vnitřní standard), dicyklohexylamin a anilin. K píkům, které se eluují po anilinu (artefakty), se nepřihlíží.

Sírany *(2.4.13)*. 1,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g)). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí bez zahřívání v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,12 mg $C_6H_{12}NNaO_3S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii dihydrogenophosphas dihydricus

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného

Synonymum. Natrium dihydrogenphosphoricum

$NaH_2PO_4 . 2H_2O$ M_r 156,01 CAS 13472-35-0

M_r bezvodého 119,98

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny NaH_2PO_4.

Vlastnosti

Bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je slabě kyselý *(2.2.4)*.

B. Roztok S vyhovuje zkouškám na fosforečnany *(2.3.1)*.

C. Roztok S předem zneutralizovaný roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,2 až 4,5; měří se 5 ml roztoku S zředěného 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Redukující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 5 min se zahřívá ve vodní lázni; roztok zůstává slabě červený.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 5 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 21,5 % až 24,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 130 °C.

Stanovení obsahu

2,500 g se rozpustí ve 40 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* prostým uhličitanů za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 0,120 g NaH_2PO_4.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii disulfis

Disiřičitan sodný

Synonyma. Natrii metabisulfis, Natrii pyrosulfis, Natrium pyrosulfurosum

$Na_2S_2O_5$ M_r 190,10 CAS 7681-57-4

Obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $Na_2S_2O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce Hodnota pH, viz Zkoušky na čistotu.

B. 1 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 10 ml. K 0,4 ml *jodu RS* se přidá 8 ml *vody destilované R* a 1 ml zředěného roztoku S; roztok je bezbarvý a vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 5,0; měří se roztok S.

Thiosírany. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Roztok zůstane čirý *(2.2.1)* nejméně 15 min.

Arsen *(2.4.2)*. 0,20 g se smíchá s 2 ml *vody R* v odpařovací misce a po kapkách se přidá 1,5 ml *kyseliny dusičné R*. Směs se odpaří do sucha na vodní lázni, zahřívá se nad plamenem, dokud se nepřestane vyvíjet pára. Zbytek se rozpustí v 25 ml *vody R;* roztok vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 40 ml roztoku S v křemenném kelímku se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí v 19 ml *vody R* a přidá se 1 ml roztoku *fluoridu sodného R* (40 g/l). 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS*, přidá se 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 4,753 mg $Na_2S_2O_5$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Natrii fluoridum

Fluorid sodný

Synonymum. Natrium fluoratum

NaF M_r 41,99 CAS 7681-49-4

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny NaF.

Vlastnosti

Bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Ke 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,5 ml *chloridu vápenatého RS;* vznikne bílá gelovitá sraženina, která se rozpustí po přidání 5 ml *chloridu železitého RS1*.

B. K asi 4 mg se přidá směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS* a promíchá se; červené zbarvení se změní na žluté.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* bez zahřívání a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 2,5 g *dusičnanu draselného R* se rozpustí ve 40 ml roztoku S a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 50 ml. Roztok se ochladí na 0 °C a přidá se 0,2 ml *fenolftaleinu RS*. Jestliže je roztok bezbarvý, spotřebuje se ke vzniku červeného zbarvení stálého nejméně 15 s nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Jestliže je roztok červený, spotřebuje se ke změně zbarvení indikátoru nejvýše 0,25 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Fluorokřemičitany. Zneutralizovaný roztok ze zkoušky Kysele nebo zásaditě reagující látky se zahřeje k varu a horký se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*, kterého se ke změně zbarvení indikátoru na červené spotřebuje nejvýše 0,75 ml.

Sírany *(2.4.13)*. 0,25 g se rozpustí v 10 ml nasyceného roztoku *kyseliny borité R* ve *vodě destilované R*. Přidá se 5 ml *vody destilované R* a 0,6 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1*. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g). Porovnávací roztok se připraví smícháním 0,6 ml *kyseliny*

chlorovodíkové RS1, 5 ml základního *roztoku síranů (10 g SO_4/ml)* a 10 ml nasyceného roztoku *kyseliny borité R* ve *vodě destilované R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 3 h suší v sušárně při 130 C.

Stanovení obsahu

K 80,0 mg se přidá směs 5 ml *acetanhydridu R* a 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a zahřívá se do rozpuštění. Po ochlazení se přidá 20 ml *dioxanu R* a potom 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 4,199 mg NaF.

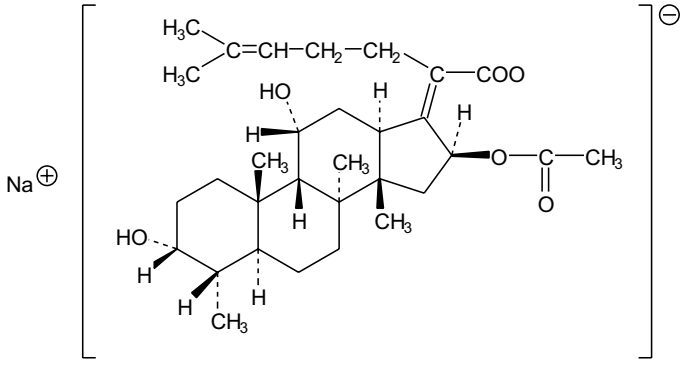
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

† Natrii fusidas

Sodná sůl kyseliny fusidové



$C_{31}H_{47}NaO_6$ $_r$ 538,70 CAS 751-94-0

Je to sodná sůl kyseliny (*Z*)-16ß-acetoxy-3α,11α-dihydroxy-4α,8α,14ß-trimethyl-18-nor--5α,9ß,13α-cholesta-17(20),24-dien-21-ové; antimikrobiální látka produkovaná při růstu určitých kmenů *Fusidium coccineum* nebo získaná jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{31}H_{47}NaO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je slabě hygroskopická, snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se infračervená absorpční spektrofotometrie (*2.2.24*). 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 5 ml *chloroformu R*, 0,1 ml *kyseliny fosforečné zředěné RS* a 1 min se silně třepe. Vrstvy se nechají oddělit a spodní vrstva se zfiltruje přes vatu s vrstvou *síranu sodného bezvodého R*. Extrakce se opakuje ještě dvakrát pokaždé s 5 ml *chloroformu R* a spojené extrakty se odpaří za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se suší 2 h nad *oxidem fosforečným R* za sníženého tlaku, potom se rozpustí v 1 ml *chloroformu R*, spektrum se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. kyseliny fusidové*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 24 mg *diethanolamoniumfusidatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny octové ledové R*, *cyklohexanu R* a *chloroformu R* (2,5 + 10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 1 g se spálí. Zbytek vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,5 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_6 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,125 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *kyseliny 3-ketofusidové CRL* se rozpustí v 5 ml mobilní fáze. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,20 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 µl zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m až 0,15 m a vnitřního průměru 4 mm až 5 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *methanolu R*, roztoku *kyseliny fosforečné R* (10 g/l), *vody R* a *acetonitrilu R* (10 + 20 + 20 + 50),
- průtokové rychlosti 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm,
- injektorové smyčky, 20 µl.

Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 3,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě hlavního píku a píku rozpouštědla, není větší než dvojnásobek plochy píku odpovídajícího sodné soli kyseliny fusidové na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %). K píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b), se nepřihlíží. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem kyseliny 3-ketofusidové a píkem sodné soli kyseliny fusidové na chromatogra

mu porovnávacího roztoku (a) je nejméně 2,5 a poměr signálu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) k šumu je nejméně 3.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve 30 ml *vody R,* přidá se 40 ml *lihu 96% R* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 53,87 mg $C_{31}H_{47}NaO_6$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

Natrii hydrogenocarbonas

Hydrogenuhličitan sodný

$NaHCO_3$ M_r 84,01 CAS 144-55-8

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $NaHCO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Zahřátím v suchém stavu nebo v roztoku se postupně mění na uhličitan sodný.

Zkoušky totožnosti

A. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* vznikne slabě růžové zbarvení. Zahřátím se uvolňuje plyn a roztok se zbarví červeně.

B. Vyhovuje zkoušce na uhličitany a hydrogenuhličitany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí v 90 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Uhličitany. Hodnota pH *(2.2.3)* čerstvě připraveného roztoku S není vyšší než 8,6.

Chloridy *(2.4.4)*. K 7 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (150 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K suspenzi připravené z 1,0 g a 10 ml *vody destilované R* se přidává *kyselina chlorovodíková R* do neutrální reakce a 1 ml se přidá navíc a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na amonium (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 5 ml *vody R* a 10 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)*.

Arsen *(2.4.2)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. K suspenzi připravené rozpuštěním 1,0 g v 10 ml *vody destilované R* se přidává *kyselina chlorovodíková R* až do neutrální reakce a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (100 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 18 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Stanovení obsahu

1,500 g se rozpustí v 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R,* přidá se 0,2 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 84,0 mg $NaHCO_3$.

Natrii hydrogenophosphas dihydricus

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného

Synonymum. Dinatrii phosphas dihydricus

$Na_2HPO_4 . 2H_2O$ M_r 177,99 CAS 10028-24-7

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny Na_2HPO_4.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystalky. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je slabě alkalický *(2.2.4)*.

B. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

D. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Redukující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l RS* a zahřívá se 5 min na vodní lázni; zbarvení roztoku zůstane slabě červené.

Dihydrogenfosforečnan sodný. Ze spotřeby *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* (25 ml) a spotřeby *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* (n_1 ml a n_2 ml) ze zkoušky Stanovení obsahu se vypočítá poměr:

$$\frac{n_2 - 25}{25 - n_1},$$

který je nejvýše 0,025.

Chloridy *(2.4.4)*. K 2,5 ml roztoku S se přidá 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (400 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 3 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (4 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (40 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 19,5 % až 21,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 130 °C.

Stanovení obsahu

2,000 g (m g) se rozpustí v 50 ml *vody R* a přidá se 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS*. Titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* k prvnímu inflexnímu bodu pH křivky (n_1 ml). Pokračuje se v titraci do druhého inflexního bodu křivky (celková spotřeba *hydroxidu sodného 1 mol/l VS*, n_2 ml).

Obsah Na_2HPO_4 v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{1420(25 - n_1)}{m(100 - d)},$$

v němž značí:
d - ztrátu sušením v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného

Synonyma. Dinatrii phosphas dodecahydricus, Natrium hydrogenphosphoricum

$Na_2HPO_4 . 12H_2O$ M_r 358,14 CAS 10039-32-4

Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny Na_2HPO_4.

Vlastnosti

Bezbarvé průsvitné krystalky, na vzduchu větrající. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na fosforečnany *(2.3.1)*.

B. Roztok S vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Redukující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,25 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a zahřívá se 5 min na vodní lázni; zbarvení roztoku zůstane slabě červené.

Dihydrogenfosforečnan sodný. Ze spotřeby *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* (25 ml) a spotřeby *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* (n_1 ml a n_2 ml) ze zkoušky Stanovení obsahu se vypočítá poměr:

$$\frac{n_2 - 25}{25 - n_1},$$

který je nejvýše 0,025.

Chloridy *(2.4.4)*. K 2,5 ml roztoku S se přidá 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. K 3 ml roztoku S se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 57,0 % až 61,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije směs objemových dílů *methanolu R* a *dimethylformamidu R* (10 + 40).

Stanovení obsahu

4,00 g (*m* g) se rozpustí ve 25 ml *vody R*, přidá se 25,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* k prvnímu inflexnímu bodu titrační křivky (n_1 ml). Pokračuje se v titraci do druhého inflexního bodu křivky (celková spotřeba *hydroxidu sodného 1 mol/l VS*, n_2 ml).

Obsah Na_2HPO_4 v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{1420(25 - n_1)}{m(100 - d)},$$

v němž značí:
d - obsah vody v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Natrii hydroxidum

Hydroxid sodný

NaOH M_r 40,00 CAS 1310-73-2

Obsahuje 97,0 % až 100,5 % celkových alkálií, počítáno jako NaOH.

Vlastnosti

Bílá krystalická hmota ve formě čoček, tyčinek nebo destiček. Na vzduchu zvětrává, snadno absorbuje oxid uhličitý. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml. Hodnota pH *(2.2.3)* tohoto roztoku není nižší než 11,0.

B. 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovují zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. *Dále uvedený postup se provede opatrně.*

5,0 g se rozpustí ve 12 ml *vody destilované R*, přidá se 17 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1*, upraví se pH roztoku na 7 *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Uhličitany. Nejvýše 2,0 %, počítáno jako Na_2CO_3; stanoví se při stanovení obsahu.

Chloridy *(2.4.4)*. 1,0 g se rozpustí v 5 ml *vody R*, okyselí se 4 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok, do něhož se již *kyselina dusičná zředěná RS* nepřidává, vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 3,0 g se rozpustí v 6 ml *vody destilované R*, pH roztoku se upraví na hodnotu 7 *kyselinou chlorovodíkovou R* (asi 7,5 ml) a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí v asi 80 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS*. Potom se přidá 0,3 ml *oranže methylové RS* a pokračuje se v titraci *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS*.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* spotřebované při druhé části titrace odpovídá 0,1060 g Na_2CO_3.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* spotřebované při spojené titraci odpovídá 40,00 mg NaOH.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných nekovových obalech.

Separandum.

Natrii iodidum

Jodid sodný

Synonymum. Natrium iodatum

NaI M_r 149,89 CAS 7681-82-5

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny NaI.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na jodidy *(2.3.1)*.

B. Roztok S vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. K 12,5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,7 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Jodičnany. K 10 ml roztoku S se přidá 0,25 ml *škrobu prostého jodidu RS* a 0,2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a nechá se 2 min stát chráněn před světlem; nevzniká modré zbarvení.

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 μg/g).

Thiosírany. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *škrobu RS* a 0,1 ml *jodu 0,005 mol/l VS;* vznikne modré zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 1,000 g se suší 3 h při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

1,300 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 20,0 ml tohoto roztoku se přidá 40 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a titruje se *jodičnanem draselným 0,05 mol/l VS* do změny červeného zbarvení na žluté. Přidá se 5 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za silného protřepávání do odbarvení chloroformové vrstvy.

1 ml *jodičnanu draselného 0,05 mol/l VS* odpovídá 14,99 mg NaI.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Natrii lactatis solutio

Roztok mléčnanu sodného

Je to roztok obsahující směs enanciomerů. Obvykle je to racemát, ale (+)-(*S*) izomer může převládat. Obsahuje nejméně 50,0 % sodné soli kyseliny 2-hydroxypropionové ($C_3H_5NaO_3$; M_r 112,06; CAS 72-17-3) a 96,0 % až 104,0 % deklarovaného množství mléčnanu sodného (uvedeno v označení).

Vlastnosti

Čirá bezbarvá slabě sirupovitá kapalina. Je mísitelný s vodou a s lihem 96%.

Zkoušky totožnosti

A. K 0,1 ml se přidá 10 ml *vody R*. 5 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce na mléčnany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. Množství zkoušeného přípravku odpovídající 40,0 g mléčnanu sodného se zředí *vodou destilovanou R* na 200,0 ml.

Vzhled roztoku. Zkoušený přípravek je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barvený roztok $HŽ_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,5 až 9,0, měří se zkoušený přípravek.

Redukující cukry a sacharosa. K 5 ml zkoušeného přípravku se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,2 ml *síranu měďnatého RS*. Roztok je čirý a modrý a zůstane takový i po povaření. K horkému roztoku se přidají 4 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 min se vaří. Přidá se 6 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a znovu se zahřeje k varu. Roztok je čirý a modrý.

Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*. Provede se head-space plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Roztok rozpouštědel. 0,5 g *methanolu R* a 1,0 g *ethanolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Roztok zkoušeného přípravku. Množství zkoušeného přípravku odpovídající 0,500 g mléčnanu sodného se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Zkoušený roztok. 2,0 ml roztoku zkoušeného přípravku a 1,0 ml *vody R* se převedou do injekční nádobky.
Porovnávací roztok. 2,0 ml roztoku zkoušeného přípravku a 1,0 ml roztoku rozpouštědel se převedou do injekční nádobky.

Nádobky se ochladí v ledové lázni a do každé se přidají 3,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (500 g/l).

Nastříkne se 1 ml plynné fáze zkoušeného roztoku a 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku. Plocha píku odpovídajícího methanolu a plocha píku odpovídajícího ethanolu na chromatogramu zkoušeného roztoku není větší než poloviny ploch odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (250 μg methanolu/g a 500 μg ethanolu/g, počítáno jako mléčnan sodný).

Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků, dialyzačních roztoků, hemodialyzačních roztoků nebo hemofiltračních roztoků, obsahuje nejvýše 50 μg methanolu/g, počítáno jako mléčnan sodný.

Chloridy *(2.2.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g, počítáno jako mléčnan sodný).

Šťavelany a fosforečnany. K 1 ml zkoušeného přípravku se přidá 15 ml *lihu 96% R* a 2 ml *chloridu vápenatého RS* a zahřívá se 5 min při 75 °C. Opalescence roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 1 ml zkoušeného přípravku, 15 ml *lihu 96% R* a 2 ml *vody R*.

Sírany *(2.4.13)*. 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g, počítáno jako mléčnan sodný).

Hliník. Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků, dialyzačních roztoků, hemodialyzačních roztoků nebo hemofiltračních roztoků, obsahuje nejvýše 0,1 μg Al/g, stanoveno

atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*). Pro přípravu roztoků se použije zařízení prosté hliníku nebo takové, které za podmínek použití neuvolňuje hliník (sklo, polyethylen atd.).

Roztok modifikátoru. 100,0 g *dusičnanu amonného R* se rozpustí ve směsi 50 ml *vody R* a 4 ml *kyseliny dusičné R* a zředí se *vodou R* na 200 ml.
Kontrolní roztok. 2,0 ml roztoku modifikátoru se zředí *vodou R* na 25,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,25 g se přidají 2,0 ml roztoku modifikátoru a zředí se *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se těsně před použitím (0,010 μg Al/ml až 0,050 μg Al/ml) za použití základního *roztoku hliníku (200 μg Al/ml)*.

Změří se absorbance při 309,3 nm za použití hliníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, grafitové pícky jako atomizéru a *argonu R* jako nosného plynu. Přístroj je vybaven nespecifickým korekčním systémem absorpce. Pícka se zahřívá na 120 °C po tolik sekund, pokud jsou zaváděny mikrolitry roztoku do přístroje, pak se 30 s zahřívá na 1000 °C a nakonec 6 s na 2700 °C.

Baryum. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *síranu vápenatého RS* a nechá se 30 min stát. Opalescence *(2.2.1)* roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku připraveného současně a za stejných podmínek za použití směsi 10 ml roztoku S a 10 ml *vody destilované R.*

Těžké kovy *(2.4.8).* 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g, počítáno jako mléčnan sodný). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml).*

Železo *(2.4.9).* 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g, počítáno jako mléčnan sodný).

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14).* Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 5 m.j. endotoxinu v gramu.

Stanovení obsahu

Množství zkoušeného přípravku odpovídající 75,0 mg mléčnanu sodného se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové ledové R* a 20 ml *acetanhydridu R.* Nechá se stát 15 min, potom se přidá 1 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/1 VS.*

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,21 mg $C_3H_5NaO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro výrobu dialyzačních roztoků, hemodialyzačních roztoků a hemofiltračních roztoků,
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků,
- deklarovaný obsah mléčnanu sodného.

Natrii laurilsulfas

1998

Laurylsíran sodný

Synonyma. Natrium laurylsulfuricum, Natrii laurylsulfas

CAS 151-21-3

Je to směs sodných solí alkylsíranů, která obsahuje hlavně sodnou sůl kyseliny dodecylsírové ($C_{12}H_{25}NaO_4S$; M_r 288,38). Látka obsahuje nejméně 85,0 % sodných solí alkylsíranů, počítaných jako $C_{12}H_{25}NaO_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý prášek nebo krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě za vzniku opalizujícího roztoku, částečně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a protřepe se; vytvoří se bohatá pěna.

B. K 0,1 ml roztoku připraveného ve zkoušce A se přidá 0,1 ml roztoku *modře methylenové R* (1 g/l), 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 2 ml *dichlormethanu R* a protřepe se; dichlormethanová vrstva se zbarví intenzivně modře.

C. Asi 10 mg se smíchá s 10 ml *ethanolu R*. Zahřeje se k varu na vodní lázni, intenzivně se protřepe, okamžitě se zfiltruje a odpaří se ethanol. Zbytek se rozpustí v 8 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS,* roztok se odpaří na polovinu objemu a ochladí. Ztuhlé mastné alkoholy se odfiltrují a k filtrátu se přidá 1 ml *chloridu barnatého RS1;* vytvoří se bílá krystalická sraženina.

D. 0,5 g se vyžíhá; zbytek vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Zásaditě reagující látky. 1,0 g se rozpustí ve 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,1 ml *červeně fenolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*.

Neesterifikované alkoholy. 10 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidá se 100 ml *lihu 96% R* a třikrát se protřepe s 50 ml *pentanu R*. Přidá se *chlorid sodný R*, pokud je to třeba pro lepší oddělení vrstev. Spojené organické vrstvy se třikrát promyjí vždy 50 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují a odpaří na vodní lázni, až rozpouštědlo není již zřetelně cítit. Zbytek se zahřívá 15 min při 105 °C a ochladí se. Odparek váží nejvýše 0,4 g (4 %).

Chlorid sodný a síran sodný. Nejvýše celkem 8,0 % NaCl a Na_2SO_4.

Chlorid sodný. 5,00 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, po kapkách se přidává *kyselina dusičná zředěná RS*, až je roztok neutrální na *papír lakmusový modrý R,* přidají se 2 ml *chromanu draselného RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 5,844 mg NaCl.

Síran sodný. 0,500 g se rozpustí ve 20 ml *vody R,* je-li třeba za mírného zahřátí, a přidá se 1 ml roztoku *dithizonu R1 (dithizon R* obsahující 98,0 % $C_{13}H_{12}N_4S$) (0,5 g/l) v *acetonu R*. Pokud má roztok červené zbarvení, přidává se po kapkách *kyselina dusičná 1 mol/l VS*, dokud se roztok nezbarví modrozeleně. Přidají se 2,0 ml *kyseliny dichloroctové RS*, 80 ml *acetonu R* a titruje se *dusičnanem olovnatým 0,01 mol/l VS* do stálého oranžovočerveného zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *dusičnanu olovnatého 0,01 mol/l VS* odpovídá 1,420 mg Na_2SO_4.

Stanovení obsahu

1,15 g se rozpustí ve *vodě R*, je-li třeba mírným zahřátím, a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Ke 20,0 ml tohoto roztoku se přidá 15 ml *chloroformu R* a 10 ml *dimidiumbromidu se sulfanovou modří RS* a titruje se *benzethoniumchloridem 0,004 mol/l VS* za intenzivního protřepávání. Před každým přidáním odměrného roztoku se nechají vrstvy oddělit a titruje se do změny růžového zbarvení chloroformové vrstvy na šedomodré.

1 ml *benzethoniumchloridu 0,004 mol/l VS* odpovídá 1,154 mg sodných solí alkylsíranů, počítaných jako $C_{12}H_{25}NaO_4S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii nitroprussias

1998

Nitroprussid sodný

$Na_2[Fe(CN)_5NO] . 2H_2O$ M_r 297,95 CAS 13755-38-9

M_r bezvodého 261,92

Je to dihydrát pentakyano-nitrosylželezitanu sodného. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $Na_2[Fe(CN)_5NO]$.

Vlastnosti

Červenohnědý prášek nebo krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 0,700 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 350 nm až 600 nm ihned po přípravě roztoku. Roztok vykazuje absorpční maximum při 395 nm, prodlevu asi při 510 nm a minimum při 370 nm. Specifická absorbance v maximu je 0,65 až 0,80.

B. 20 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *sulfidu sodného RS;* vznikne tmavě fialovočervené zbarvení.

C. 50 mg se rozpustí v 1 ml *vody R* a okyselí se přidáním *kyseliny chlorovodíkové R*. Kapka tohoto roztoku barví oxidační plamen trvale žlutě.

Zkoušky na čistotu

Nerozpustné látky. 10 g se rozpustí bez zahřívání v 50 ml *vody R* a nechá se 30 min stát. Potom se zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16). Filtr se promývá studenou *vodou R*, dokud není filtrát bezbarvý. Zbytek na filtru se vysuší při 105 °C; zbytek neváží více než 1 mg (100 μg/g).

Chloridy (*2.4.4*). 1,0 g se smíchá v kovovém (niklovém) kelímku s 8 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l). Pomalu se zahřívá a opatrně se odpaří do sucha nad mírným plamenem, pak se 30 min žíhá do temně červeného žáru a nechá se ochladit. Pevný zbytek se převede třemi dávkami *kyseliny sírové zředěné RS* po 8 ml a spojené kyselinové podíly se zfiltrují přes papírový filtr. Filtrát se okyselí na *papír lakmusový R* přidáním několika kapek *kyseliny sírové zředěné RS,* je-li třeba. Kelímek i filtrační papír se promyjí třikrát 10 ml *vody R*, promývací vody se přidají k roztoku kyseliny sírové a zředí se *vodou R* na 60 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Hexakyanoželezitany. 1,25 g se rozpustí v *tlumivém roztoku octanovém o pH 4,6* a zředí se jím na 50,0 ml (zkoušený roztok). Použijí se tři 50ml odměrné baňky (A, B, C). Do baňky B se dá 1,0 ml základního *roztoku hexakyanoželezitanu (50 μg $Fe(CN)_6$/ml)*. Do baňky A a B se dá po 1 ml roztoku *síranu amonno-železnatého R* (5 g/l). Do všech baněk se odměří 10,0 ml zkoušeného roztoku, zředí se *vodou R* na 50,0 ml a nechá se 30 min stát. Absorbance *(2.2.25)* roztoku A měřená při 720 nm proti roztoku C jako kontrolní tekutině není větší než absorbance roztoku B měřená při 720 nm proti roztoku A jako kontrolní tekutině (200 μg/g).

Hexakyanoželeznatany. 4,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml (zkoušený roztok). Použijí se tři 50ml odměrné baňky (A, B, C). Do baňky B se dají 2,0 ml základního *roztoku hexakyanoželeznatanu (100 μg $Fe(CN)_6$/ml)*. Do baňky A a B se dá po 1 ml *chloridu železitého RS2*. Do všech baněk se odměří 25,0 ml zkoušeného roztoku, zředí se *vodou R* na 50,0 ml a nechá se 30 min stát. Absorbance *(2.2.25)* roztoku A měřená při 695 nm proti roztoku C jako kontrolní tekutině není větší než absorbance roztoku B měřená při 695 nm proti roztoku A jako kontrolní tekutině (200 μg/g).

Sírany. Pro přípravu a ředění roztoků se použije *voda destilovaná R*.

Zkoušený roztok. 3,6 g se rozpustí ve 120 ml *vody R*, přidá se směs 4 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 20 ml roztoku *chloridu měďnatého R* (250 g/l), zředí se *vodou R* na 150,0 ml a nechá se 16 h stát. Potom se zfiltruje nebo odstředí do získání čirého světle modrého roztoku.
Porovnávací roztok. Ke 40 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* se přidá 80 ml *vody R* a 12 ml až 13 ml roztoku *chloridu měďnatého R* (250 g/l) a zředí se *vodou R* na 150,0 ml. Přidaný objem roztoku chloridu měďnatého má být takový, aby zbarvení konečného roztoku bylo shodné se zbarvením zkoušeného roztoku.

Roztoky se nechají stát, potom se oba roztoky zfiltrují a prvních 25 ml filtrátu se odstraní. Ke 100 ml filtrátu obou roztoků se přidá po 0,5 ml *kyseliny octové R*, promíchá se, přidají se 2 ml roztoku *chloridu barnatého R* (250 g/l) a znovu se promíchá. Opalescence zkoušeného roztoku není intenzivnější než opalescence porovnávacího roztoku (100 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 9,0 % až 15,0 %; stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití stříbrné elektrody jako indikační a merkurosulfatové elektrody jako srovnávací.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,10 mg $Na_2[Fe(CN)_5NO]$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Natrii perboras

N

Perboritan sodný

$NaBO_2 . H_2O_2 . 3H_2O$ M_r 153,86 CAS 10042-94-1

Obsahuje 96,0 % až 103,0 % sloučeniny $NaBO_2 . H_2O_2 . 3H_2O$.

Vlastnosti

Bezbarvé hranolovité krystaly nebo bílý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě za mírného rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. Vodný roztok reaguje zásaditě na *papír lakmusový červený R.*

B. 1 ml nasyceného roztoku zkoušené látky se smíchá s 1 ml *kyseliny sírové 1 mol/l RS* a s 0,2 ml roztoku *dichromanu draselného R* (70 g/l). Roztok se protřepe se 2 ml *etheru R;* etherová vrstva se barví modře.

C. 1 g se v porcelánovém kelímku smíchá s 0,2 ml *kyseliny sírové R* a 0,5 ml *methanolu R;* po zapálení hoří směs nazelenalým plamenem.

D. Vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Arsen *(2.4.2).* 0,38 g se zahřívá na porcelánové misce se 2 ml *kyseliny sírové R* a 2 ml *vody R*, dokud se vyvíjejí bílé páry. Po ochlazení se přidají 2 ml *vody R* a znovu se zahřívá, dokud se vyvíjejí bílé páry. Po ochlazení se přidá 50 ml *vody R* a 5 ml roztoku chloridu cínatého (připraví se zředěním 1 ml *chloridu cínatého RS kyselinou chlorovodíkovou R* na 100 ml) a zředí se *vodou R* na 75 ml. 25 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na arsen (8 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g se rozpustí zahřátím v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 2 mol/l RS* a odpaří se za stálého míchání do sucha. Odparek se rozpustí ve 20 ml horké *vody R.* 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml).*

Železo *(2.4.9)*. 6 ml roztoku pro zkoušku Těžké kovy se zředí *vodou R* na 10 ml; roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (80 μg/g).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,15 g vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,13 g se rozpustí ve 150 ml *vody destilované R;* 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1,2 %).

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 10 ml *kyseliny sírové 1 mol/l RS* a titruje se *manganistanem draselným 0,02 mol/l VS*.

1 ml *manganistanu draselného 0,02* mol/l VS odpovídá 7,693 mg $NaBO_2 . H_2O_2 . 3H_2O$

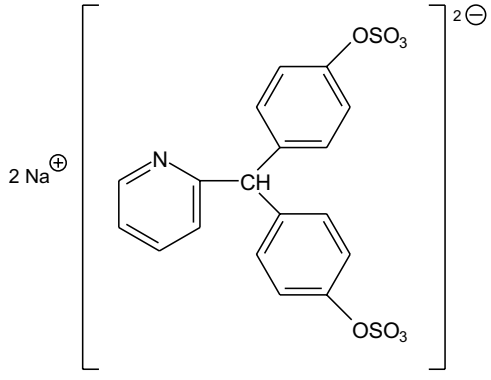
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

† Natrii picosulfas

Pikosíran sodný

Synonymum. Natrium picosulfuricum



$C_{18}H_{13}NNa_2O_8S_2 . H_2O$ M_r 499,42 CAS 10040-45-6

Je to monohydrát disodné soli kyseliny 4,4′-(2-pyridylmethylen)bis(fenylsírové). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{18}H_{13}NNa_2O_8S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *pikosíranu sodného CRL.*

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřeje se k varu. Přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1;* vznikne bílá sraženina.

D. K asi 10 mg se přidají 3 ml *kyseliny sírové R* a 0,1 ml *dichromanu draselného RS1;* vzniká fialové zbarvení.

E. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí v *destilované vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $ZŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 0,25 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *pikosíranu sodného CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,20 g zkoušené látky se rozpustí ve 2 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (103 g/l). Směs se zahřeje rychle k varu a vaří se 10 s. Potom se ochladí ve vodě s ledem a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R, methanolu R* a *ethylacetatu R* (2,5 + 12,5 + 25 + 60) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu horkého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Potom se vrstva postříká roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (200 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se 10 min při 110 °C. Horká vrstva se postříká čerstvě připraveným roztokem obsahujícím *chlorid železitý R* (50 g/l) a *hexakyanoželezitan draselný R* (1 g/l) a pozoruje se vlhká vrstva. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny tři zřetelně oddělené skvrny. Čtvrtá skvrna může být na startu.

Chloridy (*2.4.4*). 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 µg/g).

Sírany (*2.4.13*). 7,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (400 µg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 10 ml základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 3,0 % až 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 80 ml *methanolu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 48,14 mg $C_{18}H_{13}NNa_2O_8S_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

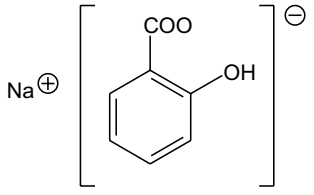
Nečistoty

A. natrium-4-[(2-pyridyl)(4-hydroxyfenyl)methyl]fenyl-sulfat,
B. 4,4′-[(2-pyridyl)methylen]bisfenol.

Natrii salicylas

Salicylan sodný

Synonymum. Natrium salicylicum



$C_7H_5NaO_3$ M_r 160,10 CAS 54-21-7

Je to sodná sůl kyseliny 2-hydroxybenzoové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_5NaO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo malé bezbarvé krystalky nebo lesklé šupinky. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *salicylanu sodného CRL.*

B. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na salicylany *(2.3.1)*.

C. Vyhovuje zkoušce (b) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 20 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně fenolové RS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červenofialové se spotřebují nejvýše 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Chloridy *(2.4.4)*. K 5 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. 10 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (600 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,5 g se rozpustí v 15 ml směsi objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (5 + 10). 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví zředěním základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)* připraveného zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *lihu 96% R* (5 + 10).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,130 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,01 mg $C_7H_5NaO_3$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Natrii sulfas

Síran sodný

Synonyma. Natrium sulfuricum siccum, Natrii sulfas anhydricus

Na_2SO_4 M_r 142,04 CAS 7757-82-6

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % Na_2SO_4.

Vlastnosti

Bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na sírany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,2 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (450 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (450 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (45 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (90 μg/g).

Hořčík. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *glycerolu 85% R,* 0,15 ml *žluti titanové RS*, 0,25 ml *šťavelanu amonného RS*, 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a protřepe se. Růžové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 5 ml základního *roztoku hořčíku (10 μg Mg/ml)* a 5 ml *vody R* (200 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 130 °C.

Stanovení obsahu

1,300 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a tento roztok se nechá projít sloupcem *katexu silně kyselého R* rychlostí 4 ml/min. Sloupec se promyje *vodou R* (asi 300 ml), až se na neutralizaci 50 ml promývací tekutiny spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. K eluátu se přidá 0,1 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 71,0 mg Na_2SO_4.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii sulfas decahydricus

Dekahydrát síranu sodného

Synonymum. Natrium sulfuricum

$Na_2SO_4 . 10H_2O$ M_r 322,19 CAS 7727-73-3

M_r bezvodého 142,04

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % Na_2SO_4.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé průsvitné krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%, částečně se rozpouští ve vlastní krystalické vodě při asi 33 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na sírany *(2.3.1)*.

B. Vyhovuje zkouškám na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* nebo 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (2 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na vápník (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (40 μg/g).

Hořčík. K 10 ml roztoku S se přidá 1 ml *glycerolu 85% R*, 0,15 ml *žluti titanové RS*, 0,25 ml *šťavelanu amonného RS*, 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a protřepe se. Růžové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 5 ml základního *roztoku hořčíku (10 μg Mg/ml)* a 5 ml *vody R* (100 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 52,0 % až 57,0 %; 1,000 g se 1 h suší při 30 °C a potom při 130 °C.

Stanovení obsahu

3,000 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a tento roztok se nechá projít sloupcem *katexu silně kyselého R* rychlostí 4 ml/min. Sloupec se promyje *vodou R* (asi 300 ml), až se na neutralizaci 50 ml promývací tekutiny spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. K eluátu se přidá 0,1 ml *oranže methylové RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS*.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 71,0 mg Na_2SO_4.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii sulfis

Siřičitan sodný

Synonymum. Natrii sulfis anhydricus

Na_2SO_3 M_r 126,04 CAS 7757-83-7

Obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny Na_2SO_3.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je slabě zásaditý *(2.2.4)*.

B. K 5 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *jodu 0,05 mol/l RS;* roztok je bezbarvý a vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

D. Rozmezí pro stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Roztok S1. K 10,0 g se přidá 25 ml *vody R*, protřepává se až do rozpuštění většiny zkoušené látky, postupně a opatrně se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda I)*.

Thiosírany. K 2,00 g se přidá 100 ml *vody R*, protřepe se, přidá se 10 ml *formaldehydu R*, 10 ml *kyseliny octové R* a nechá se 5 min stát. Potom se přidá 0,5 ml *škrobu RS* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška; rozdíl spotřeb mezi oběma titracemi je nejvýše 0,15 ml (0,1 %).

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Selen. Ke 3,0 g se přidá 10 ml *formaldehydu R*, postupně a opatrně se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 20 min na vodní lázni. Růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 1,0 g zkoušené látky, ke které bylo přidáno 0,2 ml základního *roztoku selenu (100 μg Se/ml)* (10 μg/g).

Zinek. Nejvýše 25 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 2,0 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku zinku (100 μg Zn/ml)* zředěného *vodou R* podle potřeby.

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Těžké kovy *(2.4.8)* 12 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Stanovení obsahu

0,250 g se přenese do 500ml kuželové baňky obsahující 50,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a protřepává se až do úplného rozpuštění Přidá se 1 ml *škrobu RS* a přebytek jodu se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 6,30 mg Na_2SO_3.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Natrii sulfis heptahydricus

Siřičitan sodný

Synonymum. Natrium sulfurosum

$Na_2SO_3 . 7H_2O$ M_r 252,14 CAS 10102-15-5

Je to heptahydrát siřičitanu sodného. Obsahuje 48,0 % až 52,5 % sloučeniny Na_2SO_3.

Vlastnosti

Bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je slabě zásaditý *(2.2.4)*.

B. K 5 ml roztoku S se přidá 0,5 ml *jodu 0,05 mol/l RS;* roztok je bezbarvý a vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

D. Rozmezí pro stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Roztok S1. Ke 20,0 g se přidá 25 ml *vody R* a protřepává se až do rozpuštění většiny zkoušené látky, potom se postupně a opatrně přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda I)*.

Thiosírany. K 4,00 g se přidá 100 ml *vody R*, protřepe se, přidá se 10 ml *formaldehydu R*, 10 ml *kyseliny octové R* a nechá se 5 min stát. Potom se přidá 0,5 ml *škrobu RS* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška; rozdíl spotřeb mezi oběma titracemi je nejvýše 0,15 ml (0,05 %).

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce na železo (5 μg/g).

Selen. K 6,0 g se přidá 10 ml *formaldehydu RS*, postupně a opatrně se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 20 min na vodní lázni. Růžové zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 2,0 g zkoušené látky, ke které bylo přidáno 0,2 ml základního *roztoku selenu (100 μg Se/ml)* (5 μg/g).

Zinek. Nejvýše 12 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I)*.

Zkoušený roztok. 2,0 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku zinku (100 μg Zn/ml)* zředěného *vodou R* podle potřeby.

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S1 vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Stanovení obsahu

0,500 g se přenese do 500ml kuželové baňky obsahující 50,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a protřepává se až do úplného rozpuštění. Přidá se 1 ml *škrobu RS* a přebytek jodu se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 6,30 mg Na_2SO_3.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii tetraboras

Tetraboritan sodný

Synonyma. Borax, Natrium tetraboricum

$Na_2B_4O_7 . 10H_2O$ M_r 381,37 CAS 1303-96-4

M_r bezvodého 201,22

Je to dekahydrát tetraboritanu disodného. Obsahuje 99,0 % až 103,0 % sloučeniny $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky nebo krystalická zvětrávající hmota. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný ve vroucí vodě, snadno rozpustný v glycerolu.

Zkoušky totožnosti

A. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové R*, 5 ml *methanolu R* a zapálí se. Plamen má zelený okraj.

B. K 5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Roztok se zbarví červeně. Po přidání 5 ml *glycerolu (85%) R* barva zmizí.

C. Roztok S vyhovuje zkoušce na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 4,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 9,0 až 9,6; měří se roztok S.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 3 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 12 ml *vody destilované R*.

Amonium *(2.4.1)*. 6 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 14 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na amonium (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 2,5 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)* a 7,5 ml *vody R*.

Arsen *(2.4.2)*. 5 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Vápník *(2.4.3)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na vápník (100 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití směsi 6 ml základního *roztoku vápníku (10 μg Ca/ml)* a 9 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (25 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Stanovení obsahu

20 g *mannitolu R* se rozpustí, je-li třeba zahřátím, ve 100 ml *vody R*. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a neutralizuje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku růžového zbarvení. K tomuto roztoku se přidají 3,00 g zkoušené látky a zahřívá se do úplného rozpuštění. Po ochlazení se titruje *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* opět do vzniku růžového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 0,1907 g $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Natrii thiosulfas

Thiosíran sodný

Synonymum. Natrium thiosulfuricum

$Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ M_r 248,17 CAS 10102-17-7

Je to pentahydrát thiosíranu sodného. Obsahuje 99,0 % až 101,0 % $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$.

Vlastnosti

Bezbarvé průsvitné krystaly, zvětrávající na suchém vzduchu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Částečně se rozpouští ve vlastní krystalické vodě při asi 49 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Odbarvuje *jod RS*.

B. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,5 ml *vody R* a 2 ml *dusičnanu stříbrného RS2;* tvoří se bílá sraženina, jejíž zbarvení se rychle mění na nažloutlé a potom na černé.

C. K 2,5 ml roztoku S se přidá 2,5 ml *vody R* a 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R;* vysráží se síra a tvoří se plyn, který barví *papír škrobový s jodičnanem draselným R* na modro.

D. 1 ml roztoku S vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,4; měří se roztok S.

Chloridy *(2.4.4)*. K 5 ml roztoku S se přidá 15 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 3 min až 4 min se mírně vaří. Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se zředí *vodou R* na 25 ml. 12,5 ml roztoku se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany a siřičitany. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 10 ml. Ke 3 ml tohoto roztoku se nejdříve přidají 2 ml *jodu RS* a potom se přidává *jod RS* po kapkách do vzniku velmi slabého stálého žlutého zbarvení. Roztok se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany *(2.4.13)* (0,2 %).

Sulfidy. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml čerstvě připraveného roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l); roztok se nezbarví fialově.

Těžké kovy. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *sulfidu sodného RS* a nechá se 2 min stát; hnědé zbarvení roztoku není intenzivnější než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)* (10 μg/g).

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve 20 ml *vody R* a titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace.

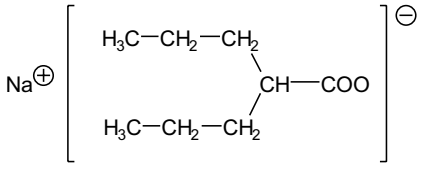
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 24,82 mg $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

† Natrii valproas

Sodná sůl kyseliny valproové



$C_8H_{15}NaO_2$ M_r 166,20 CAS 1069-66-5

Je to sodná sůl kyseliny 2-propylvalerové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{15}NaO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli kyseliny valproové CRL*. Pokud se spektrum zkoušené látky získané v pevném stavu liší od spektra referenční látky, zaznamená se spektrum tablety připravené z *bromidu draselného R* a 50 μl roztoku zkoušené látky v *methanolu R* (100 g/l), který se odpaří ve vakuu. Tablety se měří ihned po přípravě.

B. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (c) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovují zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve 20 ml *vody destilované R* v dělicí nálevce, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a protřepe se. Směs se nechá 12 h stát; použije se spodní vrstva.

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Tento roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Na změnu zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,75 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,75 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *kyseliny máselné R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 20 mg *kyseliny máselné R* se rozpustí v *etheru R* a zředí se jím na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,500 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a vytřepe se třikrát 20 ml *etheru R*. Ke spojeným etherovým výtřepkům se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu, protřepe se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří za použití rotační vakuové odparky při teplotě nepřevyšující 30 °C na objem asi 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 40 mg se rozpustí ve 100 ml *vody R*. S 10 ml tohoto roztoku se postupuje stejně jako u zkoušeného roztoku (a).
Zkoušený roztok (c). 40 mg se rozpustí ve 100 ml *vody R*. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a vytřepe se třikrát 5 ml *etheru R*. Spojené etherové výtřepky se protřepou se *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a filtrát se odpaří za použití rotační vakuové odparky při teplotě nepřevyšující 30 °C na objem asi 10 ml.
Porovnávací roztok. Připraví se stejným způsobem jako zkoušený roztok (c) za použití *sodné soli kyseliny valproové CRL*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony z borosilikátového skla délky 2,6 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R2,* impregnovanou 5 % *makrogolu 20 000 2-nitroftalatu R* a 1 % *kyseliny fosforečné R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje při 150 °C až 170 °C tak, aby se získal retenční čas pro hlavní pík (kyselina valproová) asi 12 min. Teplota dávkovacího prostoru se udržuje při 200 °C a teplota

detektoru se udržuje při 300 °C. Doporučuje se použít elektronický integrátor. Zaznamená se chromatogram odpovídající 2,5násobku retenčního času kyseliny valproové. Citlivost se nastaví tak, aby výška píku odpovídajícího kyselině máselné na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) nebyla menší než 70 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) rozlišení mezi píkem vnitřního standardu a hlavním píkem není menší než 12. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku rozpouštědla a píku vnitřního standardu, není větší než plocha píku vnitřního standardu (0,4 %). K píku rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 1 % plochy píku vnitřního standardu, se nepřihlíží.

Chloridy *(2.4.4)*. K 5 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. Roztok S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,1500 g se rozpustí ve 25 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,62 mg $C_8H_{15}NaO_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

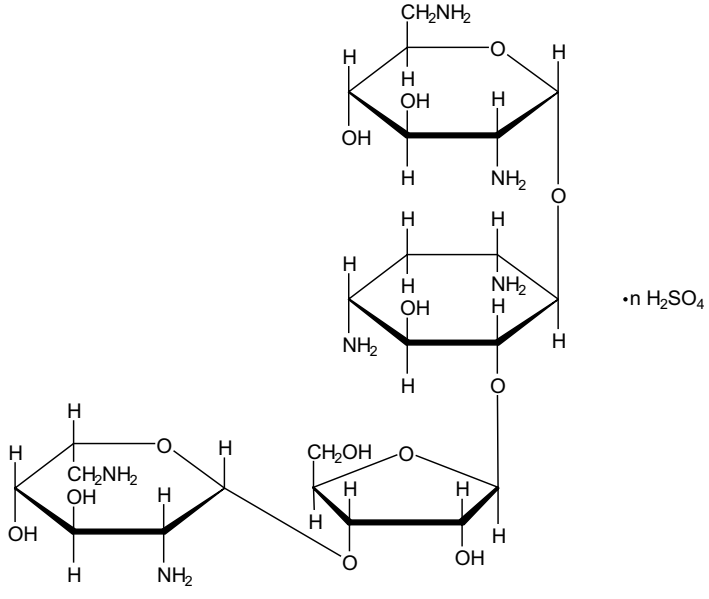
Separandum.

† Neomycini sulfas

1998

Neomyciniumsulfat

Synonymum. Neomycinium sulfuricum



$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$. nH_2SO_4 M_r 614,65 (báze) CAS 1405-10-3

Je to směs síranů látek produkovaných vybranými kmeny *Streptomyces fradiae* nebo získaných jiným způsobem. Hlavní složkou je O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-α-D-glukopyranosyl-(1→4)-O--[O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-ß-L-idopyranosyl-(1→3)-ß-D-*ribo*-furanosyl-(1→5)]-2-deoxy-D-streptamoniumsulfat (neomycin B).

Počítáno na vysušenou látku, účinnost je nejméně 680 m.j. v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Neomycin C, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 7,5; měří se následující roztok: 0,1 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +53,5° až +59,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Neamin. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok. 0,250 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 mg *neaminu CRL* se rozpustí v 1,0 ml *vody R.*
Porovnávací roztok (b). Smíchá se 0,5 ml zkoušeného roztoku s 0,5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně v 5mm proužcích po 5 μl každého roztoku. Proužky se vysuší a vyvíjí se směsí objemových dílů *dichlormethanu R, amoniaku 26 % R* a *methanolu R* (10 + 20 + + 30) po dráze nejméně 8 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C, postříká se *zkoumadlem ninhydrinovým s chloridem cínatým R* a 15 min se zahřívá při 110 °C. Potom se vrstva znovu postříká stejným zkoumadlem a zahřívá se 15 min při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající neaminu intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže jsou na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Neomycin C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *framycetiniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 40 mg *neomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně v 5mm proužcích po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *chloridu sodného R* (200 g/l) (20 + 80) po dráze nejméně 12 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrna odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně získané na porovnávacím roztoku (c); skvrna neomycinu C s hodnotou R_F o málo nižší, než je hodnota R_F hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (15 %), ale je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je patrna skvrna s hodnotou R_F o málo nižší, než je hodnota R_F hlavní skvrny.

Sírany. 27,0 % až 31,0 % (SO_4), počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a *amoniakem 26% R* se upraví pH roztoku na hodnotu 11. Přidá se 10,0 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *ftaleinpurpuru R* a titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se začíná barva roztoku měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud nezmizí fialově modré zbarvení.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranů (SO_4).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 8,0 %; 1,00 g se suší 3 h nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

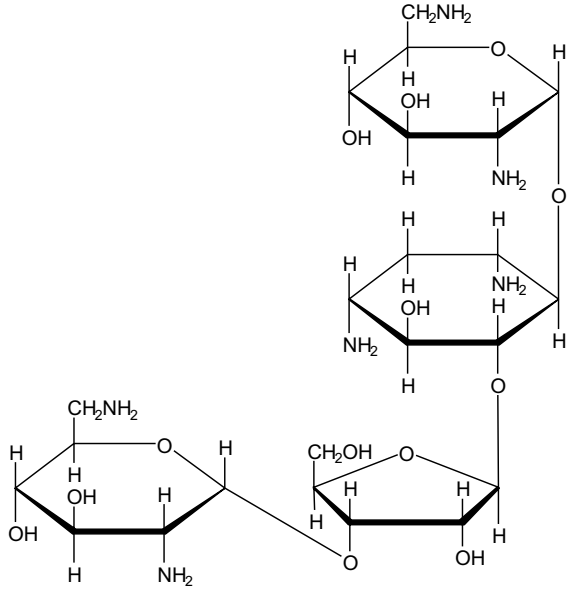
Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik *(2.7.2)* za použití *neomyciniumsulfatu CRL* jako referenční látky.

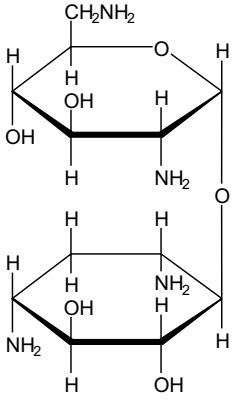
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



A. neomycin C,



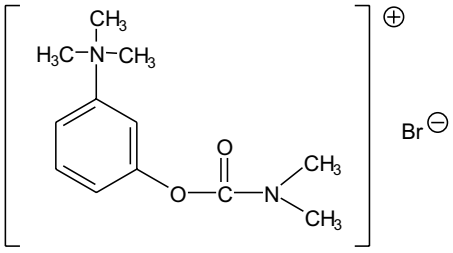
B. neamin.

†† Neostigmini bromidum

1998

Neostigminiumbromid

Synonymum. Neostigminium bromatum



$C_{12}H_{19}BrN_2O_2$ M_r 303,20 CAS 114-80-7

Je to 3-(dimethylkarbamoyloxy)fenyltrimethylamoniumbromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{19}BrN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20 mg se rozpustí v *kyselině sírové 0,5 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 260 nm a 266 nm. Specifická absorbance v maximu při 260 nm je asi 16 a v maximu při 266 nm je asi 14.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *neostigminiumbromidu CRL.*

C. Asi 50 mg se zahřívá 3 min na vodní lázni ve směsi 0,4 g *hydroxidu draselného R* a 2 ml *lihu 96% R;* nahradí se odpařený líh. Po ochlazení se přidají 2 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny diazobenzensulfonové RS1;* vzniká oranžovočervené zabarvení.

D. Vyhovuje zkouškám na bromidy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

(3-Hydroxyfenyl)trimethylamoniumbromid. 50 mg se rozpustí ve směsi 1 ml *uhličitanu sodného RS* a 9 ml *vody R.* Absorbance (*2.2.25*) měřená ihned po přípravě roztoku při 294 nm není větší než 0,25.

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,225 g se rozpustí ve 2 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

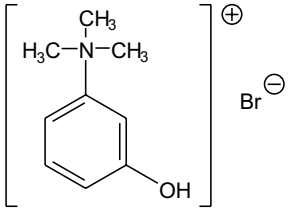
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,32 mg $C_{12}H_{19}BrN_2O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

Nečistoty

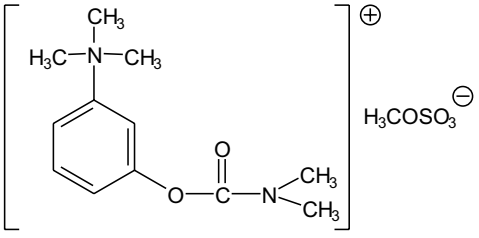


A. (3-hydroxyfenyl)trimethylamoniumbromid.

†† Neostigmini metilsulfas

Neostigminiummethylsulfat

Synonymum. Neostigminium methylsulfuricum



$C_{13}H_{22}N_2O_6S$ M_r 334,39 CAS 51-60-5

Je to 3-(dimethylkarbamoyloxy)fenyltrimethylamoniummethylsulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{22}N_2O_6S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 144 °C až 149 °C.

B. 50 mg se rozpustí v *kyselině sírové 0,5 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 261 nm a 267 nm. Poměr absorbance v maximu při 267 nm k absorbanci v maximu při 261 nm je 0,84 až 0,87. Totožnost lze hodnotit, jestliže ve zkoušce Rozlišovací schopnost (*2.2.25*) není poměr absorbancí menší než 1,9.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *neostigminiummethylsulfatu CRL*.

D. 50 mg se zahřívá 3 min na vodní lázni ve směsi 0,4 g *hydroxidu draselného R* a 2 ml *lihu 96% R;* nahradí se odpařený líh. Po ochlazení se přidají 2 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny diazobenzensulfonové RS1;* vzniká oranžovočervené zabarvení.

E. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody destilované R* a přidá se 1 ml *chloridu barnatého RS1;* nevzniká žádná sraženina. Přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 min se zahřívá ve vodní lázni; vznikne jemná bílá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. Ke 4,0 ml roztoku S se přidá 6,0 ml *vody R* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS1;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je červený. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok je červený nebo žlutočervený.

(3-Hydroxyfenyl)trimethylamoniummethylsulfat. 50 mg se rozpustí ve směsi 1 ml *uhličitanu sodného RS* a 9 ml *vody R.* Absorbance (*2.2.25*) měřená ihned po přípravě roztoku při 294 nm není větší než 0,20.

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 150 ml *vody R,* přidá se 100 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a destiluje se. Destilát se jímá do 40 ml roztoku *kyseliny borité R* (40 g/l). Destiluje se až k celkovému objemu v nádobce asi 250 ml a destilát se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za použití 0,25 ml *červeně methylové RS* jako indikátoru. Provede se slepá zkouška.

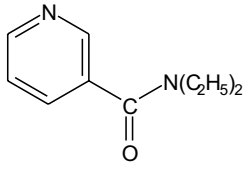
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,44 mg $C_{13}H_{22}N_2O_6S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

† Nicethamidum

Nikethamid



$C_{10}H_{14}N_2O$ M_r 178,23 CAS 59-26-7

Je to diethylamid kyseliny 3-pyridinkarboxylové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{14}N_2O$.

Vlastnosti

Olejovitá kapalina nebo krystalická hmota, bezbarvá nebo slabě nažloutlá. Je mísitelný s vodou, s lihem 96% a s etherem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,15 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm ve 2cm vrstvě; roztok vykazuje absorpční maximum při 263 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 285.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *nikethamidu CRL*.

C. 0,1 g se zahřívá s 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Postupně se uvolňuje diethylamin charakteristického pachu zbarvující *papír červený lakmusový R* modře.

D. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 250 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml *bromkyanu RS*, 3 ml roztoku *anilinu R* (25 g/l) a protřepe se; vzniká žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled. Zkoušená látka je kapalina nebo mírným zahřátím vzniklá kapalina, která je čirá (*2.2.1*) a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 7,8; měří se roztok S.

Index lomu (*2.2.6*). 1,524 až 1,526.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *ethylnikotinamidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *1-propanolu R* a *chloroformu R* (25 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající ethylnikotinamidu intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající ethylnikotinamidu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 5 ml *acetanhydridu R* a 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,82 mg $C_{10}H_{14}N_2O$.

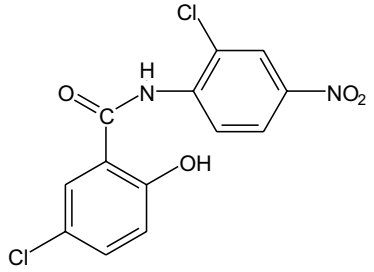
Uchovávání

Separandum.

† Niclosamidum

Niklosamid

Synonymum. Niclosamidum anhydricum



$C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$ M_r 327,12 CAS 50-65-7

Je to N-(2-chlor-4-nitrofenyl)-5-chlorsalicylamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Slabě nažloutlé nebo nažloutlé jemné krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 227 °C až 232 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *niklosamidu CRL*. Měří se tablety obsahující asi 0,5 mg látky a 0,3 g *bromidu draselného R*.

C. K 50 mg se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 0,1 g *zinku práškového R*, zahřívá se 10 min ve vodní lázni, ochladí se a zfiltruje. K filtrátu se přidá 1 ml roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l) a nechá se 3 min stát. Potom se přidají 2 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l), protřepe se, nechá se 3 min stát, přidají se 2 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l); vznikne fialové zbarvení.

D. Zkoušená látka na měděném drátku zbarví nesvítivý plamen zeleně.

E. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R*, ochladí se a zředí se stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonitrilem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *acetonitrilem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku obsahujícího 2 g/l *dihydrogenfosforečnanu draselného R*, 1 g/l *hydrogenfosforečnanu sodného R* a 2 g/l *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku odpovídajícího niklosamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 20 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se po 20 µl obou roztoků a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času niklosamidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě píku niklosamidu a píku rozpouštědla, není větší než čtyřnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 10 % plochy píku niklosamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Kyselina 5-chlorsalicylová.

Zkoušený roztok. K 1,0 g se přidá 15 ml *vody R*, 2 min se vaří, ochladí se, zfiltruje se membránovým filtrem (velikost pórů 0,45 µm), filtr se promyje, filtrát a promývací tekutina se spojí a zředí se *vodou R* na 20,0 ml.

Porovnávací roztok. 30 mg *kyseliny 5-chlorsalicylové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

K 10,0 ml zkoušeného roztoku a k 10,0 ml porovnávacího roztoku se přidá po 0,1 ml *chloridu železitého RS2*. Vzniklé fialové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (60 µg/g).

2-Chlor-4-nitroanilin.

Zkoušený roztok. K 0,250 g se přidá 5 ml *methanolu R*, zahřeje se k varu, ochladí se, přidá se 45 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*, opět se zahřeje k varu, ochladí se, zfiltruje a filtrát se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *chlornitroanilinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 20,0 ml.

K 10,0 ml zkoušeného roztoku a k 10,0 ml porovnávacího roztoku se přidá po 0,5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l) a nechá se 3 min stát. Potom se přidá 1 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l), protřepe se, nechá se 3 min stát, přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l); vzniklé růžovofialové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (100 µg/g).

Chloridy (*2.4.4*). Ke 2 g se přidá směs 1,2 ml *kyseliny octové R* a 40 ml *vody R*, 2 min se vaří, ochladí se a zfiltruje. 2 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 µg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3000 g se rozpustí v 80 ml směsi stejných objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R* a titruje se *tetrabutylammoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

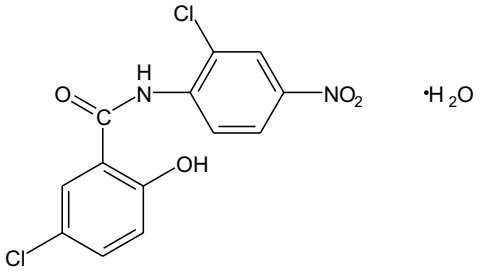
1 ml *tetrabutylammoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,71 g $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem
Separandum.

† Niclosamidum monohydricum

Monohydrát niklosamidu



$C_{13}H_8Cl_2N_2O_4 \cdot H_2O$ M_r 345,14 CAS 73360-56-2

Je to monohydrát N-(2-chlor-4-nitrofenyl)-5-chlorsalicylamidu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Nažloutlé jemné krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 227 °C až 232 °C, před stanovením se látka 4 h suší při 100 °C až 105 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *niklosamidu CRL*. Zkoušená látka se před měřením suší 4 h při 100 °C až 105 °C. Měří se tablety obsahující asi 0,5 mg látky a 0,3 g *bromidu draselného R*.

C. K 50 mg se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 0,1 g *zinku práškového R*, zahřívá se 10 min ve vodní lázni, ochladí se a zfiltruje. K filtrátu se přidá 1 ml roztoku *dusitanu sodné*

ho R (5 g/l) a nechá se 3 min stát. Potom se přidají 2 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l), protřepe se, nechá se 3 min stát, přidají se 2 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l); vznikne fialové zbarvení.

D. Zkoušená látka na měděném drátku zbarví nesvítivý plamen zeleně.

E. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R*, ochladí se a zředí se stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonitrilem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *acetonitrilem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku obsahujícího 2 g/l *dihydrogenfosforečnanu draselného R*, 1 g/l *hydrogenfosforečnanu sodného R* a 2 g/l *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R*. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku odpovídajícího niklosamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 20 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se po 20 µl obou roztoků a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času niklosamidu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě píku niklosamidu a píku rozpouštědla, není větší než čtyřnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 10 % plochy píku niklosamidu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Kyselina 5-chlorsalicylová.

Zkoušený roztok. K 1,0 g se přidá 15 ml *vody R*, 2 min se vaří, ochladí se, zfiltruje se membránovým filtrem (velikost pórů 0,45 µm), filtr se promyje, filtrát a promývací tekutina se spojí a zředí se *vodou R* na 20,0 ml.

Porovnávací roztok. 30 mg *kyseliny 5-chlorsalicylové R* se rozpustí ve 20 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

K 10,0 ml zkoušeného roztoku a k 10,0 ml porovnávacího roztoku se přidá po 0,1 ml *chloridu železitého RS2*. Vzniklé fialové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (60 µg/g).

2-Chlor-4-nitroanilin.

Zkoušený roztok. K 0,250 g se přidá 5 ml *methanolu R*, zahřeje se k varu, ochladí se, přidá se 45 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*, opět se zahřeje k varu, ochladí se, zfiltruje a filtrát se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *chlornitroanilinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 20,0 ml.

K 10,0 ml zkoušeného roztoku a k 10,0 ml porovnávacího roztoku se přidá po 0,5 ml roztoku *dusitanu sodného R* (5 g/l) a nechá se 3 min stát. Potom se přidá 1 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (20 g/l), protřepe se, nechá se 3 min stát, přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l). Vzniklé růžovofialové zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (100 μg/g).

Chloridy (*2.4.4*). Ke 2 g se přidá směs 1,2 ml *kyseliny octové R* a 40 ml *vody R*, 2 min se vaří, ochladí se a zfiltruje. 2 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (500 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 4,5 % až 6,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3000 g se rozpustí v 80 ml směsi stejných objemových dílů *acetonu R* a *methanolu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,71 g $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$.

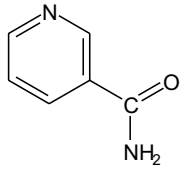
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Nicotinamidum

Nikotinamid

Synonymum. Niacinamid



$C_6H_6N_2O$ M_r 122,13 CAS 98-92-0

Je to amid kyseliny 3-pyridinkarboxylové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_6N_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, slabého charakteristického pachu. Je snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 128 °C až 131 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *nikotinamidu CRL*.

C. K 0,1 g se přidá 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zahřeje se k varu; unikající páry jsou cítit po amoniaku.

D. 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se smíchají se 2 ml *bromkyanu RS* a 3 ml roztoku *anilinu R* (25 g/l); vzniká žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 7,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *ethanolu R* a *chloroformu R* (4 + 45 + 48) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,25 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 18 h ve vakuu.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí, je-li třeba za mírného zahřátí, ve 20 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 5 ml *acetanhydridu R* a *violeť krystalová RS* jako indikátor. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zelenomodrého zbarvení.

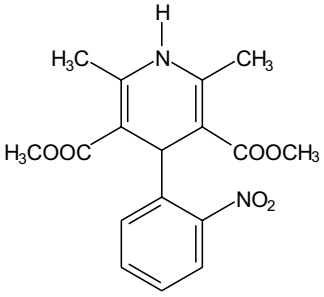
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,21 mg $C_6H_6N_2O$.

Uchovávání

Separandum.

† Nifedipinum

Nifedipin



$C_{17}H_{18}N_2O_6$ M_r 346,34 CAS 21829-25-4

Je to dimethyl-[1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrofenyl)-3,5-pyridindikarboxylat]. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{17}H_{18}N_2O_6$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v ethanolu.

Působením denního a umělého osvětlení určitých vlnových délek se snadno mění v nitrosofenylpyridinový derivát. Působením ultrafialového světla vzniká nitrofenylpyridinový derivát.

Roztoky se připravují těsně před použitím v temnu nebo za použití světla dlouhých vlnových délek (> 420 nm) a chrání se před světlem.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 171 °C až 175 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *nifedipinu CRL*. Měří se látky v pevném stavu.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *nifedipinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *cyklohexanu R* (40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, vzhledem při 254 nm a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K 25 mg ve zkumavce se přidá 10 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R*, *vody R* a *lihu R* (1,5 + 3,5 + 5) a mírným zahřátím se rozpustí. Přidá se 0,5 g *zinku R* granulo-

vaného a za občasného míchání se nechá 5 min stát. Roztok se zfiltruje do další zkumavky, k filtrátu se přidá 5 ml *dusitanu sodného R* (10 g/l) a nechá se 2 min stát. Přidají se 2 ml *amidosíranu amonného R* (50 g/l), silně se protřepe a přidají se 2 ml *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (5 g/l); vzniká intenzivní červené zbarvení, které je stálé nejméně 5 min.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,200 g se rozpustí ve 20 ml *methanolu R* a zředí se mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *nifedipinu nečistoty A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *nifedipinu nečistoty B CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a), 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) a 0,1 ml zkoušeného roztoku se smíchá a zředí se mobilní fází na 20,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R*, *methanolu R* a *vody R* (9 + 36 + 55). Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 235 nm; doporučuje se použít vhodný elektronický integrátor.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Když je chromatogram zaznamenán za výše uvedených podmínek, látky se eluují v následujícím pořadí: nečistota A, nečistota B a nifedipin; retenční čas nifedipinu je asi 15,5 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) rozlišení mezi píky odpovídajícími nečistotě A a nečistotě B je větší než 1,5; rozlišení mezi píky odpovídajícími nečistotě B a nifedipinu je větší než 1,5; výška píku odpovídajícího nečistotě A není menší než 20 % celého rozsahu zapisovače.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (c) a zaznamenají se chromatogramy po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času nifedipinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádný pík, kromě hlavního píku, píků odpovídajících nečistotě A a nečistotě B, nemá větší plochu, než je plocha píku odpovídajícího nifedipinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %), plochy píků odpovídajících nečistotě A a nečistotě B nejsou větší než plochy odpovídajících píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %), celkové množství příbuzných látek nepřevyšuje 0,3 %. Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 10 % plochy píku nifedipinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1300 g se rozpustí ve směsi 25 ml *terc. butanolu R* a 25 ml *kyseliny chloristé RS* a titruje se *tetrasulfatoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do odbarvení růžového zbarvení za použití 0,1 ml *feroinu RS* jako indikátoru. Před koncem titrace se titruje pomalu. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrasulfatoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,32 mg $C_{17}H_{18}N_2O_6$.

Uchovávání

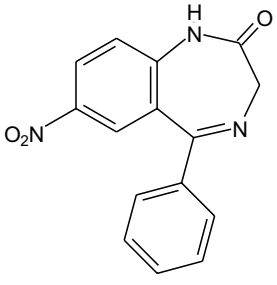
Chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. dimethyl-[2,6-dimethyl-4-(2-nitrofenyl)-3,5-pyridindikarboxylat],
B. dimethyl-[2,6-dimethyl-4-(2-nitrosofenyl)-3,5-pyridindikarboxylat].

§ Nitrazepamum

Nitrazepam



$C_{15}H_{11}N_3O_3$ M_r 281,27 CAS 146-22-5

Je to 7-nitro-5-fenyl-1*H*-1,4-benzodiazepin-2(3*H*)-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{11}N_3O_3$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 226 °C až 230 °C.

B. *Roztoky se chrání před světlem a absorbance se měří ihned po přípravě roztoku.* 25,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* (5 g/l) v *methanolu R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 280 nm. Specifická absorbance v maximu je 890 až 950.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *nitrazepamu CRL*.

D. Asi 20 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R*. 5 min se vaří, ochladí se, přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l) a směs se nechá 1 min stát. Potom se přidá 1 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (5 g/l), promíchá se a nechá se 1 min stát a přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l); vznikne červené zbarvení.

E. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R*, je-li třeba zahřátím, a přidá se 0,05 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vznikne intenzivní žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za ochrany před světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok se připraví bezprostředně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *aminonitrobenzofenonu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *nitrazepamu nečistoty A CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *nitromethanu R* (15 + 85) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající aminonitrobenzofenonu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %); žádná skvrna odpovídající nitrazepamu nečistotě A není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících aminonitrobenzofenonu a *nitrazepamu nečistotě A*, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %: stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 25 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,13 mg $C_{15}H_{11}N_3O_3$.

Uchovávání

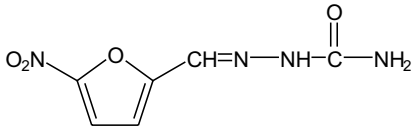
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

Nečistoty

A. 3-amino-6-nitro-4-fenylchinol-2-on,
B. 2-amino-5-nitrobenzofenon.

† Nitrofuralum

Nitrofural



$C_6H_6N_4O_4$ M_r 198,14 CAS 59-87-0

Je to 1-(5-nitrofurfuryliden)semikarbazid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_6H_6N_4O_4$.

Vlastnosti

Žlutý nebo hnědožlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. *Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem.* Použije se roztok připravený pro zkoušku Stanovení obsahu. Změří se absorbance (*2.2.25*) při 220 nm až 400 nm. Absorpční maxima jsou při 260 nm a 375 nm. Poměr absorbance měřené v maximu při 375 nm k absorbanci měřené v maximu při 260 nm je 1,15 až 1,30.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *nitrofuralu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *nitrofuralu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *nitromethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *fenylhydraziniumchloridem RS*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 1 mg se rozpustí v 1 ml *dimethylformamidu R* a smíchá se s 0,1 ml *hydroxidu draselného v lihu RS;* vznikne fialovočervené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,0. Měří se následující roztok: 1,0 g se smíchá se 100 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, protřepe se a zfiltruje.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *(5-nitro-2-furyl)methylen-diacetatu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *nitrofuralu CRL* a 10 mg *nitrofurantoinu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze složené z objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60), při průtokové rychlosti 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 310 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a), citlivost detektoru se upraví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu je rozlišení mezi píky nitrofurantoinu a nitrofuralu nejméně 2,0.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající desetinásobku retenčního času nitrofuralu, který je asi 3 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*) Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

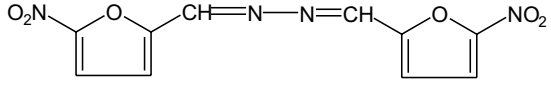
Stanovení obsahu

Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem. 60,0 mg se rozpustí ve 20 ml *dimethylformamidu R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Porovnávací roztok se připraví stejným způsobem za použití 60,0 mg *nitrofuralu CRL*. Změří se absorbance *(2.2.25*) obou roztoků v maximu při 375 nm. Vypočítá se obsah $C_6H_6N_4O_4$ z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

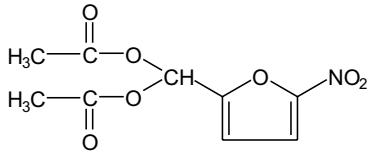
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



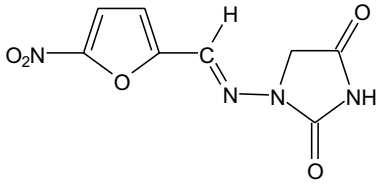
A. 5-nitro-2-furaldehydazin,



B. 5-nitro-2-furylmethandiyl-diacetat.

† Nitrofurantoinum

Nitrofurantoin



$C_8H_6N_4O_5$ M_r 238,16 CAS 67-20-9

Je to 1-(5-nitrofurfurylidenamino)-2,4–imidazolidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_8H_6N_4O_5$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek nebo žluté krystaly, bez pachu nebo téměř bez pachu. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustný v dimethylformamidu.

Zkoušky totožnosti

A. *Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem.* Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku připraveného pro zkoušku Stanovení obsahu při 220 nm až 400 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 266 nm a 367 nm. Poměr absorbance v maximu při 367 nm k absorbanci v maximu při 266 nm je 1,36 až 1,42.

B. Asi 10 mg se rozpustí v 10 ml *dimethylformamidu R*. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml *hydroxidu draselného v lihu 96% 0,5 mol/l RS;* vzniká hnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v co nejmenším množství *dimethylformamidu R* a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *nitromethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Potom se vrstva postříká *fenylhydraziniumchloridem RS* a zahřívá se 10 min při 100 °C až 105 °C. Při hodnocení v ultrafialovém světle i po postřiku vrstvy žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede za ochrany před přímým světlem.

0,120 g se rozpustí v 50 ml *dimethylformamidu R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem obsahujícím *octan sodný R* (18 g/l) a *kyselinu octovou ledovou R* 0,14% (*V/V*) na 100,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 367 nm za použití výše popsaného roztoku octanu sodného jako kontrolní kapaliny.

Obsah $C_8H_6N_4O_5$ v procentech se vypočítá za použití specifické absorbance, jejíž hodnota je 765.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě do 25 °C.

Separandum.

Nitrogenii oxidum

1998

Oxid dusný

Synonyma. Dinitrogenii oxidum, Nitrogenium oxydulatum

N_2O M_r 44,01 CAS 10024-97-2

Obsahuje nejméně 98,0 % *(V/V)* sloučeniny N_2O v plynné fázi, odebrané při 15 °C.

Vlastnosti

Bezbarvý plyn. Při 20 °C a tlaku 101 kPa se 1 objemový díl plynu rozpustí v asi 1,5 objemového dílu vody.

Výroba

Oxid dusný se vyrábí tepelným rozkladem dusičnanu amonného.

Zkouší se plynná fáze.

Pokud se zkouška provádí s tlakovou lahví, ponechá se lahev se zkoušeným plynem nejméně 6 h při pokojové teplotě ve vertikální poloze s vypouštěcím ventilem nahoře.

Oxid uhličitý. Nejvýše 300 ml/m^3; provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací plyn. Směs obsahující 300 ml/m^3 *oxidu uhličitého R1* v *oxidu dusném R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 3,5 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 15 ml/min,
- tepelně vodivostního detektoru,
- injektorové smyčky.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C a detektoru na 90 °C.

Nastříkne se zkoušený plyn a porovnávací plyn. Nastříknutý objem a pracovní podmínky se nastaví tak, aby výška píku oxidu uhličitého na chromatogramu porovnávacího plynu byla nejméně 35 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaných chromatogramech jsou zřetelně odděleny píky oxidu uhličitého a oxidu dusného.

Obsah oxidu uhličitého ve zkoušeném plynu se vypočítá pomocí plochy píku oxidu uhličitého na chromatogramu porovnávacího plynu.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*. *Pokud se zkouška provádí s tlakovou lahví, použije se první část plynu, která se odebere.*

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací plyn. Směs obsahující 5 ml/m^3 *oxidu uhelnatého R* v *oxidu dusném R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 2 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné vhodným molekulovým sítem pro chromatografii (0,5 nm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 60 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru s methanizérem.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru na 130 °C.

Nastříkne se zkoušený plyn a porovnávací plyn. Nastříknutý objem a pracovní podmínky se nastaví tak, aby výška hlavního píku oxidu uhelnatého na chromatogramu porovnávacího plynu byla nejméně 35 % celé stupnice zapisovače.

Obsah oxidu uhelnatého ve zkoušeném plynu se vypočítá pomocí plochy píku oxidu uhelnatého na chromatogramu porovnávacího plynu.

Oxid dusnatý a oxid dusičitý. Celkem nejvýše 2 ml/m^3 v plynné a kapalné fázi; stanoví se za použití chemiluminiscenčního analyzátoru *(2.5.26)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací směs (a). Oxid dusný R.
Porovnávací směs (b). Směs obsahující 2 ml/m^3 *oxidu dusnatého R* v *dusíku R1*.

Za použití porovnávacích směsí (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu dusnatého a oxidu dusičitého; odděleně se zkouší vzorky zkoušené látky odebrané z plynné fáze a z kapalné fáze.

Voda. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití elektrolytického hygrometru *(2.5.28)*.

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací plyn. Oxid dusný R.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (250 μm až 355 μm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 50 ml/min,
- tepelně vodivostního detektoru.

Teplota kolony a nástřikového prostoru se udržuje na 60 °C a detektoru na 130 °C.

Nastříkne se zkoušený plyn a porovnávací plyn. Nastříknutý objem a pracovní podmínky se nastaví tak, aby výška hlavního píku oxidu dusného na chromatogramu porovnávacího plynu byla nejméně 35 % celé stupnice zapisovače. Plocha píku oxidu dusného na chromatogramu zkoušeného plynu je nejméně 98,0 % píku oxidu dusného na chromatogramu porovnávacího plynu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. oxidu dusného.*

B. Doutnající dřevěná tříska se umístí do atmosféry zkoušeného plynu; tříska vzplane.

C. Zkoušený plyn se zavádí do *pyrogallolu zásaditého RS;* nevznikne hnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Zkouší se plynná fáze.

Pokud se zkouška provádí s tlakovou lahví, ponechá se lahev se zkoušeným plynem nejméně 6 h při pokojové teplotě ve vertikální poloze s vypouštěcím ventilem nahoře.

Oxid uhličitý. Nejvýše 300 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhličitého *(2.1.6)*.

Oxid dusnatý a oxid dusičitý. Nejvýše 2 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu dusnatého a oxidu dusičitého *(2.1.6)*.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhelnatého *(2.1.6)*.

Pokud se zkouška provádí s tlakovou lahví, použije se první část zkoušeného plynu.

Vodní pára. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci vodní páry *(2.1.6)*.

Uchovávání

Zkapalněný pod tlakem ve vhodných obalech vyhovujících ČSN 07 8510. Kohouty a ventily se nepromazávají a neolejují.

Nečistoty

A. oxid uhličitý,
B. oxid uhelnatý,
C. oxid dusnatý,
D. oxid dusičitý,
E. voda.

Nitrogenum

1998

Dusík

Synonymum. Nitrogenium

N_2 M_r 28,01 CAS 7727-37-9

Obsahuje nejméně 99,5 % (*V/V*) sloučeniny N_2.

Vlastnosti

Bezbarvý plyn, bez pachu. Při 20 °C a tlaku 101 kPa se 1 objemový díl plynu rozpustí v asi 62 objemových dílech vody a asi v 10 objemových dílech lihu 96%.

Výroba

Oxid uhličitý. Nejvýše 300 ml/m^3; stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.24)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.
Porovnávací plyn (a). *Dusík R1.*
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 300 ml/m^3 *oxidu uhličitého R1* v *dusíku R1*.

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhličitého ve zkoušeném plynu.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.25)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.
Porovnávací plyn (a). *Dusík R1.*
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 5 ml/m^3 *oxidu uhelnatého R* v *dusíku R1*.

Za použití porovnávacích plynů (a) a (b) se přístroj kalibruje a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhelnatého ve zkoušeném plynu.

Kyslík. Nejvýše 50 ml/m^3; stanoví se za použití kyslíkového analyzátoru s elektrochemickým čidlem a rozsahem 0 ml/m^3 až 100 ml/m^3.

Zkoušený plyn prochází detekční komorou obsahující vodný roztok elektrolytu, obvykle hydroxidu draselného. Přítomnost kyslíku ve zkoušeném plynu způsobuje odchylku v elektrickém signálu zaznamenaném na výstupu, která je úměrná obsahu kyslíku.

Analyzátor se kalibruje v souladu s instrukcí výrobce. Plyn se nechá proudit přístrojem za použití vhodné tlakové regulace, vzduchotěsných kovových trubic a nastavení předepsané průtokové rychlosti tak, aby bylo dosaženo konstantních odečtů.

Voda. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití elektrolytického hygrometru *(2.5.28)*.

Stanovení obsahu. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka.
Porovnávací plyn (a). Okolní vzduch.
Porovnávací plyn (b). *Dusík R1.*

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné vhodným molekulovým sítem pro chromatografii (0,5 nm),

- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- tepelně vodivostního detektoru,
- injektorové smyčky.

Teplota kolony se udržuje na 50 °C a teplota detektoru na 130 °C.

Nastříkne se porovnávací plyn (a). Nastříknutý objem a pracovní podmínky se nastaví tak, aby výška hlavního píku dusíku na chromatogramu porovnávacího plynu byla nejméně 35 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaných chromatogramech jsou zřetelně odděleny píky kyslíku a dusíku.

Nastříkne se zkoušený plyn a porovnávací plyn (b). Na chromatogramu zkoušeného plynu je plocha hlavního píku nejméně 99,5 % plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího plynu (b).

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného plynu je přibližně shodný s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího plynu (b).

B. Do 250ml kuželové baňky s atmosférou zkoušeného plynu se umístí hořící nebo doutnající dřevěná tříska; tříska zhasne.

C. Do vhodné zkumavky se umístí 0,1 g *hořčíku R* ve formě hoblin, zkumavka se uzavře zátkou s dvěma otvory, kterou prochází skleněná trubička dosahující asi 1 cm nad hobliny. Trubičkou se zavádí do baňky zkoušený plyn nejprve 1 min bez zahřátí, potom 15 min při zahřívání zkumavky do červeného žáru. Po ochlazení se přidá 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*; vznikající páry zbarvují navlhčený *papír lakmusový červený R* modře.

Zkoušky na čistotu

Oxid uhličitý. Nejvýše 300 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhličitého *(2.1.6)*.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhelnatého *(2.1.6)*.

Vodní pára. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci vodní páry *(2.1.6)*.

Uchovávání

Pod tlakem jako plyn nebo kapalina ve vhodných obalech vyhovujících ČSN 07 8510.

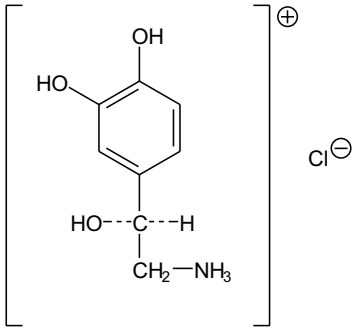
Nečistoty

A. oxid uhličitý,
B. oxid uhelnatý,
C. kyslík,
D. voda.

†† Norepinephrini hydrochloridum

Norepinefriniumchlorid

Synonymum. Noradrenalini hydrochloridum



$C_8H_{12}ClNO_3$ M_r 205,64 CAS 329-56-6

Je to (*R*)-2-hydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethylamoniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{12}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo hnědavě bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%. Působením vzduchu a světla se zbarvuje.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, D a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, C, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání (*2.2.16*). 177 °C až 179 °C.

C. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 300 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 279 nm. Specifická absorbance v maximu je 128 až 136.

D. 2 g se rozpustí ve 20 ml roztoku *disiřičitanu sodného R* (5 g/l) a zalkalizuje se přidáním *amoniaku 17,5% R*. Chladí se 1 h ve vodě s ledem a zfiltruje se. Sraženina se promyje třikrát 2 ml *vody R*, 5 ml *lihu 96% R* a nakonec 5 ml *etheru R* a suší se 3 h ve vakuu. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety takto izolované báze norepinefrinu se shoduje se spektrem tablety báze norepinefrinu stejným způsobem izolované z *norepinefriniumhydrogentartaratu CRL*.

E. K 1 ml roztoku zkoušené látky (1 g/l) se přidá 1 ml roztoku *diethoxytetrahydrofuranu R* 1% (*V/V*) v *kyselině octové ledové R* a zahřívá se 2 min při 80 °C. Po ochlazení ve vodě s ledem se přidají 3 ml roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (20 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseli-*

ny chlorovodíkové R a *kyseliny octové ledové R* (1 + 19), zamíchá se a 2 min se nechá stát; roztok se zbarví intenzivně růžově.

F. 0,2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se hodnotí ihned po přípravě. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než roztok připravený za použití 0,2 ml základního barevného roztoku modrého, 0,4 ml základního barevného roztoku žlutého, 0,4 ml základního barevného roztoku červeného a 9 ml kyseliny chlorovodíkové (10 g/l HCl) *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 4,5, měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -37 až -41 , počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Noradrenalon. 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* roztoku měřená při 310 nm není větší než 0,20 (0,12 %).

Adrenalin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,15 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 12,5 mg *epinefriniumhydrogentartaratu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml zkoušeného roztoku se smíchají se 2 ml porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se odděleně do proužků (20 mm x 2 mm) nanese 6 µl zkoušeného vzorku, 6 µl porovnávacího roztoku (a), 6 µl porovnávacího roztoku (b) a 12 µl porovnávacího roztoku (c). Usuší se na vzduchu a potom se proužky postříkají nasyceným roztokem *hydrogenuhličitanu sodného R*. Vrstva se usuší na vzduchu, proužky se dvakrát postříkají *acetanhydridem R*, přičemž se mezi postřiky usuší. Vrstva se zahřívá 90 min při 50 C a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, acetonu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *ethylendiaminu R*, *methanolu R* a roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (5 g/l) (2 + 8 + 2). Vrstva se suší 10 min při 60 C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna umístěná nad hlavní skvrnou není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,7 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) nad hlavní skvrnou je zřetelně oddělená skvrna odpovídající hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,180 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 12 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *violeti krystalové R* jako indikátoru do vzniku modrozeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,56 mg $C_8H_{12}ClNO_3$.

Uchovávání

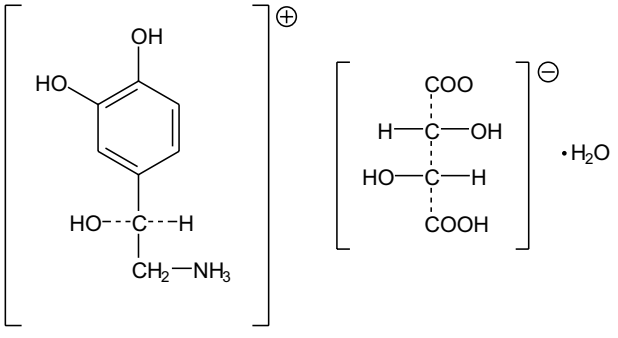
Ve vzduchotěsných obalech nebo spíše v zatavené ampulce ve vakuu nebo pod inertním plynem, chráněn před světlem.

Venenum.

†† Norepinephrini hydrogenotartras

Norepinefriniumhydrogentartarat

Synonymum. Noradrenalini tartras



$C_{12}H_{17}NO_9 . H_2O$ M_r 337,28 CAS 69815-49-2

M_r bezvodého 319,27

Je to monohydrát (*R*)-2-hydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethylamonium-(2*R*,3*R*)-hydrogentartaratu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{17}NO_9$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, bez pachu. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 2 g se rozpustí ve 20 ml roztoku *disiřičitanu sodného R* (5 g/l) a zalkalizuje se přidáním *amoniaku 17,5% R*. Chladí se 1 h ve vodě s ledem a zfiltruje se. Filtrát se použije pro zkoušku totožnosti F. Sraženina se promyje třikrát 2 ml *vody R*, 5 ml *lihu 96% R* a nakonec 5 ml *etheru R* a suší se 3 h ve vakuu. Specifická optická otáčivost *(2.2.7)* sraženiny (báze norepinefrinu) je -44° až -48°; měří se roztok (20,0 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 0,5 mol/l RS.*

B. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorban-

ce *(2.2.25)* při 250 nm až 300 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 279 nm. Specifická absorbance v maximu je 79 až 85.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety báze epinefrinu izolované ze zkoušené látky ve zkoušce totožnosti A se shoduje se spektrem tablety báze norepinefrinu stejným způsobem izolované z *norepinefriniumhydrogentartaratu CRL*.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*. K 1 ml roztoku se přidá 10 ml *tlumivého roztoku o pH 3,6* a 1 ml *jodu 0,05 mol/l RS*. Nechá se 5 min stát a přidají se 2 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l RS;* vznikne slabě červené zbarvení.

E. K 1 ml roztoku připraveného pro zkoušku totožnosti D se přidá 1 ml roztoku *diethoxytetrahydrofuranu R* 1% (*V/V*) v *kyselině octové ledové R* a zahřívá se 2 min při 80 °C. Po ochlazení ve vodě s ledem se přidají 3 ml roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (20 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *kyseliny octové ledové R* (1 + 19), zamíchá se a 2 min se nechá stát; roztok se zbarví intenzivně růžově.

F. 0,2 ml filtrátu získaného ve zkoušce totožnosti A vyhovuje zkoušce (b) na vínany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí ve *vodě R*, zředí se jí na 10 ml a roztok se hodnotí ihned po přípravě. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Noradrenalon. 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* roztoku měřená při 310 nm není větší než 0,20.

Adrenalin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 12,5 mg *epinefriniumhydrogentartaratu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml zkoušeného roztoku se smíchají se 2 ml porovnávacího roztoku (b).

Na vrstvu se odděleně do proužků (20 mm x 2 mm) nanese 6 µl zkoušeného vzorku, 6 µl porovnávacího roztoku (a), 6 µl porovnávacího roztoku (b) a 12 µl porovnávacího roztoku (c). Po usušení se proužky postříkají nasyceným roztokem *hydrogenuhličitanu sodného R*. Vrstva se usuší na vzduchu a proužky se dvakrát postříkají *acetanhydridem R*, přičemž se mezi postřiky usuší. Vrstva se zahřívá 90 min při 50 °C a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, acetonu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *ethylendiaminu R*, *methanolu R* a roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (5 g/l) (2 + 8 + 2). Vrstva se suší 10 min při 60 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna umístěná těsně nad nejintenzivnější skvrnou není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) nad nejintenzivnější skvrnou je zřetelně oddělená skvrna odpovídající nejintenzivnější skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 4,5 % až 5,8 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *violeti krystalové R* jako indikátoru do vzniku modrozeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,93 mg $C_{12}H_{17}NO_9$.

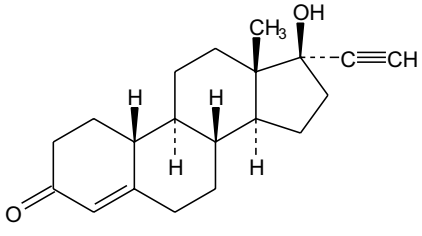
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech nebo spíše v zatavené ampulce ve vakuu nebo pod inertním plynem, chráněn před světlem.

Venenum.

† Norethisteronum

Norethisteron



$C_{20}H_{26}O_2$ M_r 298,42 CAS 68-22-4

Je to 17-hydroxy-19-nor-17α-pregn-4-en-20-in-3-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{26}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutobílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Taje při teplotě asi 206 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *norethisteronu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *chloroformu R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *křemeliny G R*. Vrstva se impregnuje v chromatografické komoře obsahující takové množství směsi objemových dílů *formamidu R* a *acetonu R* (10 + 90), aby deska byla ponořena asi 5 mm do kapaliny. Když čelo

impregnační směsi dosáhne nejméně 1 cm nad předepsanou vzdálenost pro vyvíjení mobilní fází, deska se vyjme a ponechá volně při teplotě místnosti, dokud se rozpouštědla zcela neodpaří (asi 2 min až 5 min). Vrstva se použije do 2 h po impregnaci a vyvíjení se provádí ve stejném směru jako impregnace.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *norethisteronu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *dioxanu R* a *hexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Pak se deska s vrstvou zahřívá 15 min při 120 °C, postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min až 15 min nebo do objevení skvrn při 120 °C. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou, fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a zahřívá se na vodní lázni. Roztok se zakalí a vytvoří se bílá sraženina, která při zahřívání šedne. Na stěnách zkumavky se vytvoří stříbrné zrcátko.

D. Asi 2 mg se rozpustí ve vychlazené směsi 2 ml *ethanolu R* a 2 ml *kyseliny sírové R* a zahřeje se na 70 °C. Výsledný roztok je dichroický, v procházejícím světle je modrofialový, v odraženém světle je červený. V ultrafialovém světle při 365 nm roztok vykazuje jasně červenou fluorescenci.

E. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml roztoku *butylhydroxytoluenu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* a 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS.* Roztok se zahřívá 30 min ve vodní lázni při 80 °C a ochladí se na pokojovou teplotu; vznikne nažloutle růžové zabarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,200 g se rozpustí v *dioxanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda I*).

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -33° až -37°, počítáno na vysušenou látku. Měří se 5 ml roztoku S zředěného *dioxanem R* na 10,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 10,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Roztok vykazuje absorpční maximum při 240 nm. Specifická absorbance v maximu je 550 až 590, počítáno na vysušenou látku.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 200 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *ethisteronu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9), přidá se 5 ml zkoušeného roztoku a zředí se stejnou směsí na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl a po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *chloroformu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na

vzduchu, postříká se *kyselinou sírovou v lihu RS*, zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny, přibližně stejné intenzity.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 40 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 10 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *zeleně bromkresolové RS* jako indikátoru do vzniku fialového zabarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,84 mg $C_{20}H_{26}O_2$.

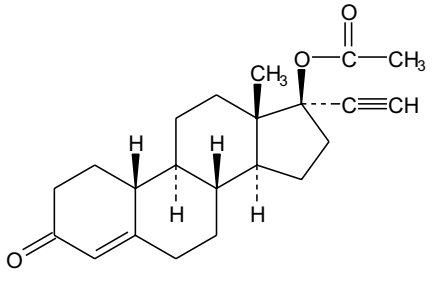
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Norethisteroni acetas

Norethisteronacetat



$C_{22}H_{28}O_3$ M_r 340,46 CAS 51-98-9

Je to 3-oxo-19-nor-17α-pregn-4-en-20-in-17-yl-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{28}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutobílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 162 °C až 165 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *norethisteronacetatu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *norethisteronacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *deoxykortonacetatu CRL* a 10 mg *norethisteronacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min nebo do objevení skvrn se zahřívá při 120 °C. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny, přibližně stejné intenzity.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zabroušené zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se 5 min probublává intenzivním proudem *dusíku R*. Zkumavka se uzavře, zahřívá se 4 h ve vodní lázni při 60 °C za ochrany před světlem a pak se nechá vychladnout.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *norethisteronacetatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zábrusové zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se 5 min probublává intenzivním proudem *dusíku R*. Zkumavka se uzavře, zahřívá se 4 h ve vodní lázni při 60 °C za ochrany před světlem a ochladí se.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a na 10 min

se vystaví působení ultrafialového světla při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušného porovnávacího roz toku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a po rovnávacího roztoku (a).

E. Asi 2 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a zahřívá se na vodní lázni. Roztok se zakalí a vytvoří se bílá sraženina, která při zahřívání šedne. Na stěnách zkumavky se vytvoří stříbrné zrcátko.

F. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -32° až -38°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *deoxykortonacetatu CRL* a 2 mg *norethisteronacetatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,20 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: 350 ml *vody R* a 600 ml *acetonitrilu R* se promíchá, po ustálení se zředí *vodou R* na 1000 ml a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) činila 70 % až 90 % celé stupnice zapisovače.

Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona promývá do ustavení rovnováhy po dobu asi 45 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: deoxykortonacetatu asi 7,5 min, norethisteronacetatu asi 9 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky deoxykortonacetatu a norethisteronacetatu je nejméně 3,5. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu R* v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 40 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 10 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,05 mg $C_{22}H_{28}O_3$.

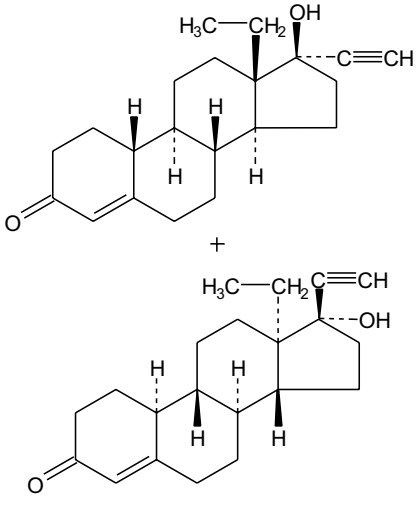
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Norgestrelum

Norgestrel



$C_{21}H_{28}O_2$ M_r 312,45 CAS 6533-00-2

Je to (±)-13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17α-pregn-4-en-20-in-3-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{21}H_{28}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Optická otáčivost (*2.2.7*). +0,05° až -0,05°; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g v *dichlormethanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *norgestrelu CRL*.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 4 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *norgestrelu CRL* a 5 mg *ethinylestradiolu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *dichlormethanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *kyselinou fosfomolybdenovou R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C a ihned se pozoruje v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 45 ml *tetrahydrofuranu R*, přidá se 10 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (100 g/l) a po 1 min se titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

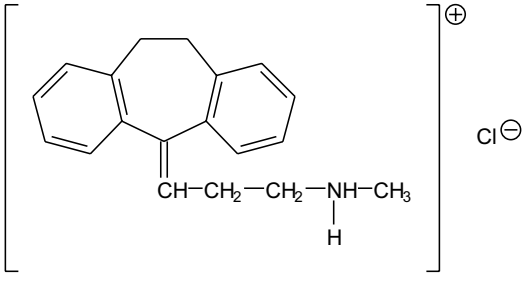
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,25 mg $C_{21}H_{28}O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Nortriptylini hydrochloridum

Nortriptyliniumchlorid



$C_{19}H_{22}ClN$ M_r 299,84 CAS 894-71-3

Je to N-methyl-N-{3-(10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyklohepten-5-yliden)-propyl}amonium-chlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{22}ClN$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 216 °C až 220 °C.

B. 20,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml a měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 239 nm. Specifická absorbance v maximu je 465 až 495.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. nortriptyliniumchloridu*.

D. 50 mg se rozpustí ve 3 ml teplé *vody R* a po ochlazení se přidá 0,05 ml roztoku *hydrochinonu R* (25 g/l) v *methanolu R;* pomalu vzniká červené zbarvení.

E. 50 mg vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,20 g se rozpustí mírným zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, zředí se jí na 10 ml, přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví žlutě. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R. Při zkoušce se roztoky a vyvíjející se chromatogramy chrání před světlem.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *dibenzosuberonu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *ethylacetatu R* a *cyklohexanu R* (3 + 15 + 85) po dráze 14 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *formaldehydu R* a *kyseliny sírové R* (4 + 96) a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,05 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 2 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve 30 ml *lihu 96% R*, přidá se 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,98 mg $C_{19}H_{22}ClN$.

Uchovávání

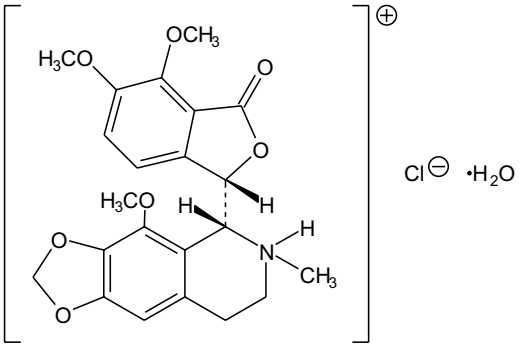
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. dibenzosuberon (dibenzo[a,d]cykloheptanon),
B. 3-(5*H*-dibenzo[*a,d*]cyklohepten-5-yliden)-N-methylpropylamin,
C. (R) a (*S*)-10,11-dihydro-5-[3-(methylamino)propyliden]-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyklohepten-10-ol.

† Noscapini hydrochloridum

Noskapiniumchlorid



$C_{22}H_{24}ClNO_7 \cdot H_2O$ M_r 467,90 CAS 912-60-7

M_r bezvodého 449,89

Je to monohydrát (1*R*)-1,2,3,4-tetrahydro-8-methoxy-1-[(3*S*)-(6′,7′-dimethoxy)ftalidyl]-6,7-methylendioxy-2-methylisochinoliniumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{24}ClNO_7$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Vodné roztoky jsou slabě kyselé. Během stání se může vysrážet báze.

Taje při teplotě asi 200 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* obsahujícím NH_3 (17 μg/g) a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maxima při 291 nm a 310 nm. Poměr absorbance v maximu při 310 nm k absorbanci v maximu při 291 nm je 1,2 až 1,3.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* sraženiny získané ve zkoušce E se shoduje se spektrem *noskapinu CRL*.

D. Sraženina získaná ve zkoušce totožnosti E taje *(2.2.14)* při 174 °C až 177 °C.

E. Asi 40 mg se rozpustí ve směsi 2 ml *vody R* a 3 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *amoniaku, zředěného RS2* a směs se zahřívá do úplného rozpuštění. Potom se ochladí za tření skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*. Sraženina se promyje *vodou R*, vysuší se při 100 °C až 105 °C a uchová se pro zkoušky totožnosti C a D.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 25 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ nebo $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. Nejméně 3,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,2 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +38,5° až +44,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, lihu 96% R, acetonu R* a *toluenu R* (1 + 3 + 20 + 20) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 2,5 % až 6,5 %; 0,200 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí zahřátím ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a po ochlazení se přidá 6 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

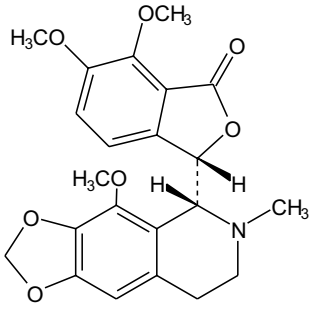
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,99 mg $C_{22}H_{24}ClNO_7$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Noscapinum

Noskapin



$C_{22}H_{23}NO_7$ M_r 413,43 CAS 128-62-1

Je to (3*S*)-6,7-dimethoxy-3-[(1*R*)-1,2,3,4-tetrahydro-8-methoxy-2-methyl-6,7-methylendioxy-1--isochinolyl]ftalid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{23}NO_7$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě při 20 °C, velmi těžce rozpustný ve vodě při 100 °C, dobře rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96% a v etheru. Rozpouští se v silných kyselinách a zředěním těchto roztoků vodou se může vysrážet báze.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 174 °C až 177 °C.

C. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 250 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maxima při 291 nm a 310 nm. Poměr absorbance v maximu při 310 nm k absorbanci v maximu při 291 nm je 1,2 až 1,3.

D. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *noskapinu CRL*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok hodnocený ihned po přípravě je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +42° až +48°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 ml každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, lihu 96% R, acetonu R* a *toluenu R* (1 + 3 + 20 + 20) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí mírným zahřátím ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,34 mg $C_{22}H_{23}NO_7$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

---

† Nystatinum

1998

Nystatin

CAS 1400-61-9

Je to antifungální látka produkovaná určitými kmeny *Streptomyces noursei*. Převážně obsahuje tetraeny, jejichž hlavní složkou je nystatin A1.

Počítáno na vysušenou látku, obsahuje v miligramu nejméně 4400 m.j.

Výroba

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li látka zkoušena, vyhoví následující zkoušce:

Neškodnost (*2.6.9*). Každé myši se vstříkne intraperitoneálně množství odpovídající nejméně 600 m.j. suspendované v 0,5 ml roztoku *arabské klovatiny R* (5 g/l).

Vlastnosti

Žlutý až slabě nahnědlý hygroskopický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dimethylformamidu, těžce rozpustný v methanolu, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku připraveného ve zkoušce Absorbance při 220 nm až 350 nm. Tento roztok vykazuje čtyři absorpční maxima, při 230 nm, 291 nm, 305 nm a 319 nm, a prodlevu při 280 nm. Poměry absorbancí v maximu při 291 nm a v maximu při 319 nm k absorbanci v maximu při 305 nm jsou 0,61 až 0,73 a 0,83 až 0,96. Poměr absorbance v maximu při 230 nm k absorbanci v prodlevě při 280 nm je 0,83 až 1,25.

B. K asi 2 mg se přidá 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové R;* vzniká hnědé zbarvení.

C. K asi 2 mg se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové R;* vzniká hnědé zbarvení, které stáním přechází na fialové.

Zkoušky na čistotu

Absorbance (*2.2.25*). 0,10 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny octové ledové R* a 50 ml *methanolu R* a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Do 30 min od přípravy roztoku je absorbance tohoto roztoku v maximu při 305 nm nejméně 0,60.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 3 h při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 0,1 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 3,5 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

Při zkoušce se roztoky chrání před světlem.

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*). Zkoušená látka a *nystatin CRL* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a ředí se směsí objemových dílů *dimethylformamidu R* a *tlumivého roztoku o pH 6,0* (5 + 95).

Uchovávání

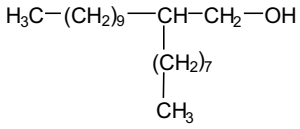
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

2324

Octyldodecanolum

Oktyldodekanol



CAS 5333-42-6

Je to kondenzační produkt nasycených kapalných mastných alkoholů. Obsahuje nejméně 90 % (*RS*)-2-oktyl-1-dodekanolu ($C_{20}H_{42}O$; M_r 298,55), zbytek se skládá především z příbuzných alkoholů.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá až nažloutlá olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mísitelný s lihem 96 %.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Hydroxylové číslo, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 20 ml.

Porovnávací roztok. 0,2 g *oktyldodekanolu CRL* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se asi 7 ml směsi objemových dílů roztoku *vanilinu R (*25 g/l) v *lihu 96 %* a *kyseliny sírové R* (1 + 4) a 5 min až 10 min se zahřívá při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se pečlivě míchá 1 min se směsí 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*, 2 ml *heptanu R* a 10 ml *vody R*. Je-li vodná vrstva modrá, spotřebuje se na změnu zbarvení roztoku na žluté nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*. Je-li vodná vrstva žlutá, přidá se 0,45 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l* a silně se třepe. Nechá se stát do úplného rozdělení vrstev; vodná vrstva je modrá.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,830 až 0,850.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,454 až 1,456.

Číslo hydroxylové *(2.5.3*, *Metoda A)*. 175 až 190.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 8,0.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 5, stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml*)

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %, stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony z křemenného skla délky 20 m a vnitřního průměru 0,3 mm pokryté filmem (0,25 μm) *poly(difenyl)(dimethyl)siloxanu R* nebo *poly(difenyl)(dimethyl)(divinyl)siloxanu R*,
- *vodíku pro chromatografii R* nebo *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1,1 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 280 °C, teplota nástřikového prostoru na 290 °C a teplota detektoru na 300 °C. Nastříknou se 2 μl zkoušeného roztoku.

Obsah $C_{20}H_{42}O$ v procentech se vypočítá z plochy píku na chromatogramu zkoušeného roztoku metodou vnitřní normalizace.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Oleomacrogolum

Oleomakrogol

Synonymum. Macrogoli aetherum oleicum

CAS 9004-98-2

Je to směs etherů směsných makrogolů s lineárními mastnými alkoholy, hlavně oleylalkoholem. Může obsahovat volné makrogoly a různá množství volného oleylalkoholu. Množství ethylenoxidu zreagovaného s oleylalkoholem je 2 až 20 oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota).

Vlastnosti

Oleomakrogol s 2 až 5 oxyethylenovými jednotkami v molekule je žlutá kapalina, prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v petroletheru.

Oleomakrogol s 10 až 20 oxyethylenovými jednotkami v molekule je žlutavě bílá voskovitá hmota, dobře rozpustná nebo dispergovatelná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v petroletheru.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok. 40 mg *oleylalkoholu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Vrstva se impregnuje vyvíjením v chromatografické komoře obsahující dostatečné množství roztoku *kyseliny šťavelové R* (30 g/l) v *lihu 96% R.* Vrstva se nechá usušit na vzduchu, odděleně se nanese po 5 μl zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjí se dvakrát *ethylacetatem R* po dráze 15 cm. Po každém vyvíjení se vrstva usuší a potom se postříká zkoumadlem vanilin--kyselina sírová připraveným následujícím způsobem: 0,50 g *vanilinu R* se rozpustí v 50,0 ml *lihu 96% R* a zředí se *kyselinou sírovou R* na 100,0 ml. Pak se vrstva usuší na vzduchu, zahřívá se 10 min při asi 130 °C a nechá se vychladnout na vzduchu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik skvrn, z nichž jedna odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

E. 0,1 g se rozpustí nebo disperguje v 5 ml *lihu 96% R*, přidají se 2 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 10 ml *chloridu barnatého RS1* a 10 ml roztoku *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l); vznikne sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 5,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50 ml. Tento roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Zásaditě reagující látky. 2,0 g se rozpustí v horké směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R* a přidá se 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS.*

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Vyhovuje hodnotám uvedeným v následující tabulce.

Počet oxyethylenových jednotek na molekulu (jmenovitá hodnota)	Číslo hydroxylové	Číslo jodové
2	158 až 178	48 až 74*
5	110 až 125	48 až 56
10	75 až 95	24 až 38
20	40 až 65	14 až 24

* Z důvodů možnosti použití dvou různých druhů oleylalkoholu pro syntézu je nutné široké rozmezí.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. Nejvýše 3,0; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

1,4-Dioxan. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se postupem uvedeným ve stati Zbytková rozpouštědla *(2.4.24)*.

Ethylenoxid. Nejvýše 1 μg/g; stanoví se head-space plynovou chromatografií *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. 1,00 g zkoušené látky (m_T) se přenese do lahvičky vhodného objemu, přidá se 1,0 ml *vody R*, a je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (a). 1,00 g (m_R) zkoušené látky se přenese do lahvičky vhodného objemu, přidá se 0,20 g ochlazeného *ethylenoxidu RS* a 0,8 ml *vody R*. Je-li třeba, zahřívá se asi 10 min při 50 °C.

Porovnávací roztok (b). K 0,1 g *ethylenoxidu RS* v lahvičce vhodné velikosti se přidá 0,1 ml čerstvě připraveného roztoku *acetaldehydu R* (0,010 g/l).

Lahvičky se ihned uzavřou zátkou s hliníkovou nebo polytetrafluoroethylenovou membránou a zátka se upevní hliníkovým uzávěrem. Obsah lahviček se homogenizuje protřepáním.

Nástřik statického head-space postupu se obvykle provádí za použití:
- rovnovážné teploty: nejméně 70 °C,
- doby ohřevu: 45 min,
- teploty převodové kapiláry: 75 °C,
- nosného plynu: *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R*,
- doby tlakování: 30 s,
- objemu nástřiku: 1 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární skleněné kolony nebo kolony z křemenného skla délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm s vnitřním povrchem potaženým 1,0 μm vrstvou *polydimethylsiloxanu R*,
- *helia pro chromatografii R* nebo *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové lineární rychlosti asi 20 cm/s a dělicím poměru 1 : 20,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje 5 min na 50 °C, pak se zvyšuje rychlostí 30 °C/min do 230 °C a 5 min se udržuje na 230 °C, přičemž teplota nástřikového prostoru se udržuje na 150 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 ml plynné fáze porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu nebyly menší než 15 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky ethylenoxidu a acetaldehydu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je nejméně 2,0 a jestliže poměr signálu píku ethylenoxidu na stejném chromatogramu k šumu je nejméně 10.

Nastříkne se odděleně vhodný objem (např. 1 ml) plynné fáze nad zkoušeným roztokem a porovnávacím roztokem (a). Postup se opakuje ještě dvakrát. Na chromatogramu zkoušeného roztoku průměrná plocha píku odpovídajícího ethylenoxidu není větší než polovina průměrné plochy odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka ploch tří nástřiků porovnávacího roztoku (a) je nejvýše 15 %.

Obsah ethylenoxidu v μg/g se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_T}{(A_R \cdot m_T) - (A_T \cdot m_R)},$$

v němž značí:

A_T - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

A_R - plochu píku odpovídajícího ethylenoxidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede počet oxyethylenových jednotek reagujících s oleylalkoholem (jmenovitá hodnota).

Olivae oleum

Olivový olej

1998

CAS 8001-25-0

Je to olej získaný ze zralých plodů druhu *Olea europaea* L. lisováním za studena nebo jiným vhodným mechanickým postupem.

Vlastnosti

Čirá žlutá nebo zelenožlutá průhledná tekutina, charakteristického pachu. Je prakticky nerozpustný v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým. Kalí se při teplotě asi 10 °C; při teplotě asi 0 °C tuhne na měkkou hmotu.

Zkoušky totožnosti

Provede se zkouška Totožnost olejů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.2*). Chromatogram zkoušené látky se shoduje s charakteristickým chromatogramem olivového oleje. Pro určité druhy olivového oleje je rozdíl mezi velikostí skvrn E a F méně významný než na obrázku.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota (*2.2.5*). 0,910 až 0,916.

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g.
Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků, je číslo kyselosti nejvýše 0,5.

Číslo peroxidové (*2.5.5*). Nejvýše 15,0. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků, je číslo peroxidové nejvýše 5,0.

Nezmýdelnitelné látky. Nejvýše 1,5 %. 5,0 g se v baňce na 150 ml smíchá s 50 ml *hydroxidu draselného v lihu 2 mol/l RS*. Zahřívá se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni za častého protřepávání. Pak se přidá zpětným chladičem 50 ml *vody R*, protřepe se a po ochlazení se převede do dělicí nálevky. Baňka se promyje po částech celkem 50 ml *etheru petrolejového R1* a promývací tekutiny se přidají do dělicí nálevky. Intenzivně se protřepává 1 min a po rozdělení vrstev se spodní vrstva převede do druhé dělicí nálevky. Tvoří-li se emulze, přidají se malá množství *lihu 96% R* nebo koncentrovaný roztok *hydroxidu draselného R*. Vodná vrstva se protřepe dvakrát 50 ml *etheru petrolejového R1*. Spojené horní vrstvy se převedou do třetí dělicí nálevky a protřepou se třikrát 50 ml *lihu* 50% (*V/V*). Vrstva etheru petrolejového se převede do předem zvážené baňky na 250 ml. Dělicí nálevka se promyje několikrát malým množstvím *etheru petrolejového R1*, promývací tekutiny se spojí s roztokem v baňce. Ether petrolejový se odpaří na vodní lázni, baňka se suší 15 min ve vodorovné poloze při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení v exsikátoru se zváží. Sušení se vždy po 15 min opakuje tak dlouho, dokud není rozdíl hmotností dvou po sobě následujících vážení větší než 0,1 %. Zbytek se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného po přidání 0,1 ml *modři bromfenolové RS*. Je-li třeba, titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS*. Vypočítá se obsah nezmýdelnitelných látek v procentech podle vzorce:

$$\frac{100\ .\ (a\ -\ 0{,}032\ .\ b)}{m},$$

v němž značí:
a - hmotnost zbytku po vysušení v gramech,
b - spotřebu *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* v mililitrech,
m - navážku zkoušené látky v gramech.

Pokud hodnota 0,032*b* je větší než 5 % hodnoty *a*, je zkouška neplatná a musí se opakovat.

Absorbance (*2.2.25*). 1,00 g se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Absorbance měřená v maximu při 270 nm není vyšší než 0,20. Poměr absorbance naměřené při 232 nm k absorbanci naměřené při 270 nm je větší než 8.

Cizí mastné oleje. Provede se zkouška Cizí oleje v mastných olejích (*2.4.22*). Podíl mastných kyselin oleje má následující složení:
- nasycené mastné kyseliny s délkou řetězce méně než C_{16}: nejvýše 0,1 %,
- kyselina palmitová: 7,5 % až 20,0 %,
- kyselina palmitolejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 16,3): nejvýše 3,5 %,
- kyselina stearová: 0,5 % až 5,0 %,
- kyselina olejová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 18,3): 56,0 % až 85,0 %,
- kyselina linolová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 18,9): 3,5 % až 20,0 %,
- kyselina linolenová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 19,7): nejvýše 1,2 %,
- kyselina arachidová: nejvýše 0,7 %,
- kyselina eikosenová (délkou řetězce odpovídá makrogoladipatu 20,3): nejvýše 0,4 %,
- kyselina behenová: nejvýše 0,2 %,
- kyselina lignocerová: nejvýše 0,2 %.

Steroly (*2.4.23*). Podíl sterolů oleje má následující složení:
- ß-sitosterol (mohou být přítomny jiné steroly s relativním retenčním časem t_R shodným s t_R ß-sitosterolu a jsou počítány jako ß-sitosterol): nejméně 93 %,
- cholesterol: nejvýše 0,5 %,
- Δ7-stigmasterol (mohou být přítomny jiné steroly s relativním retenčním časem t_R shodným s t_R Δ7-stigmasterolu a jsou počítány jako Δ7-stigmasterol): nejvýše 0,5 %,
- kampesterol: nejvýše 4 %.

Obsah stigmasterolu je menší než obsah kampesterolu.

Sezamový olej. 10 ml zkoušené látky se v odměrném válci se zabroušenou zátkou protřepává asi 1 min se směsí 0,5 ml roztoku *furfuralu R* (3,5 ml/l) v *acetanhydridu R* a 4,5 ml *acetanhydridu R.* Zfiltruje se filtračním papírem impregnovaným *acetanhydridem R*. K filtrátu se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R;* nevzniká žádné modrozelené zbarvení.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Pokud je látka určená k výrobě parenterálních lékových forem, vyhovuje následující zkoušce.

Nejvýše 0,1 % vody; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky. Použije se směs stejných objemových dílů *dekanolu R* a *methanolu bezvodého R* jako rozpouštědla.

Uchovávání

Ve zcela naplněných, dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě nejvýše 25 °C.

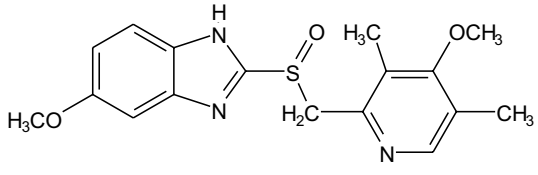
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná k přípravě parenterálních lékových forem.

---

† Omeprazolum

Omeprazol



$C_{17}H_{19}N_3O_3S$ $_r$ 345,42 CAS 73590-58-6

Je to (*RS*)-5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl)methyl]sulphinyl}-1*H*-benzimidazol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{19}N_3O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, v methanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 2,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima při 276 nm a 305 nm. Poměr absorbance zjištěné v maximu při 305 nm k absorbanci zjištěné v maximu při 276 nm je 1,6 až 1,8.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *omeprazolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Omeprazol nečistota C, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Deska s vrstvou se vloží do komory nasycené parami *kyseliny octové RS;* skvrny rychle zhnědnou.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*).

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S měřená při 440 nm je nejvýše 0,10. (Tento limit odpovídá 0,035 % omeprazol nečistotě B nebo omeprazol nečistotě A.)

Omeprazol nečistota C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 2,0 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R.*
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *omeprazolu CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *2-propanolu R*, *dichlormethanu R* předem protřepaného s *amoniakem 26% R* (100 ml *dichlormethanu R* se protřepe v dělicí nálevce s 30 ml *amoniaku 26% R*, po oddělení vrstev se použije spodní vrstva) a *dichlormethanu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna o R_F vyšším, než má skvrna odpovídající omeprazolu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 3,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 mg *omeprazolu CRL* a 1,0 mg *omeprazol nečistoty D CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (1,4 g/l), jehož pH bylo předem upraveno na hodnotu 7,6 *kyselinou fosforečnou R,* (27 + 73), průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Jestliže se chromatogramy zaznamenávají za předepsaných podmínek, retenční čas omeprazolu je asi 9 min a relativní retenční čas omeprazolu nečistoty D je asi 0,8. Nastřikuje se odděleně 40 µl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času omeprazolu. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 15 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) rozlišení mezi píky omeprazol nečistoty D a omeprazolu není menší než 3.

Pokud je třeba, upraví se pH mobilní fáze nebo koncentrace *acetonitrilu R*. Zvýšení pH zlepšuje rozlišení mezi píky.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Zbytková rozpouštědla. Provede se (head-space) plynová chromatografie (*2.2.28*) metodou standardního přídavku. Obsah chloroformu je nejvýše 50 µg/g, obsah dichlormethanu je nejvýše 100 µg/g a obsah trichlorethylenu je nejvýše 100 µg/g.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- křemenné kapilární kolony délky 30 m a vnitřního průměru 0,32 mm pokryté 1,8µm filmem *poly(kyanopropylmethylfenylmethyl)siloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru,
- vhodného head-space dávkovače.

0,50 g se odváží do 10ml "head-space lahvičky", přidají se 4,0 ml *dimethylacetamidu R* a lahvička se uzavře zátkou. Ustaluje se 1 h při 80 °C.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,2 %. 1,000 g se suší 4 h ve vakuové sušárně při 60 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,100 g se rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 40 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,5 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *hydroxidu sodného 0,5 mol/l VS* odpovídá 0,1727 g $C_{17}H_{19}N_3O_3S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

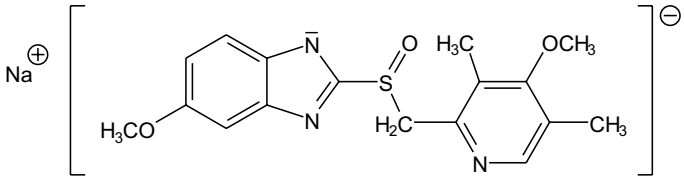
Separandum.

Nečistoty

A. 5-methoxy-1*H*-benzimidazol-2-thiol,
B. 5-methoxy-2-{[(3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]sulfinyl}-1*H*-benzimidazol,
C. 5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]thio}-1*H*-benzimidazol (ufiprazol),
D. 5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]sulfonyl}-1*H*-benzimidazol (omeprazolsulfon),
E. 2,12-dihydro-1,3-dimethyl-8-methoxy-12-thioxobenzo[4,5]pyrido[1,2-*c*]imidazo[1,2-*a*]imidazol-2--on,
F. 2,12-dihydro-1,3-dimethyl-9-methoxy-12-thioxobenzo[4,5]pyrido[1,2-*c*]imidazo[1,2-*a*]imidazol-2--on,
G. 5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]sulfinyl}-1*H*-benzimidazol-1′-oxid.

† Omeprazolum natricum

Sodná sůl omeprazolu



$C_{17}H_{18}N_3NaO_3S \cdot H_2O$ M_r 385,41

M_r bezvodého 367,40 CAS 95510-70-6

Je to monohydrát natrium-(*RS*)-5-methoxy-2{[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin -2-yl)methyl]sulfinyl}-1*H*-benzimidazol-1-idu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{18}N_3NaO_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustná v propylenglykolu a velmi těžce rozpustná v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. 2,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima při 276 nm a 305 nm. Poměr absorbance zjištěné v maximu při 305 nm k absorbanci zjištěné v maximu při 276 nm je 1,6 až 1,8.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Omeprazol nečistota C, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Deska s vrstvou se vloží do komory nasycené parami *kyseliny octové RS;* skvrny rychle zhnědnou.

C. 1 g se spálí a ochladí. Ke zbytku se přidá 1 ml *vody R,* neutralizuje se *kyselinou chlorovodíkovou R*, zfiltruje se a filtrát se zředí *vodou R* na 4 ml. 0,1 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6 (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 10,3 až 11,3; měří se roztok S.

Omeprazol nečistota C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 2,0 ml *methanolu R.*
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 9 mg *omeprazolu CRL* se rozpustí ve 2,0 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *2-propanolu R, dichlormethanu R* předem protřepaného s *amoniakem 26% R* (100 ml *dichlormethanu R* se protřepe v dělicí nálevce s 30 ml *amoniaku 26% R*, po oddělení vrstev se použije spodní vrstva) a *dichlormethanu R* (20 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna o R_F vyšším, než má skvrna odpovídající omeprazolu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 3,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 mg *omeprazolu CRL* a 1,0 mg *omeprazol nečistoty D CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (1,4 g/l), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,6 *kyselinou fosforečnou R*, (27 + 73), průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Jestliže se chromatogramy zaznamenávají za předepsaných podmínek, retenční čas omeprazolu je asi 9 min a relativní retenční čas omeprazolu nečistoty D je asi 0,8. Nastřikuje se odděleně 40 µl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času omeprazolu. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 15 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) rozlišení mezi píky omeprazolu nečistoty D a omeprazolu není menší než 3.

Pokud je třeba, upraví se pH mobilní fáze nebo koncentrace *acetonitrilu R*. Zvýšení pH zlepšuje rozlišení mezi píky.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 4,5 % až 10,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,74 mg $C_{17}H_{18}N_3NaO_3S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 5-methoxy-1*H*-benzimidazol-2-thiol,
B. 5-methoxy-2-{[(3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]sulfinyl}-1*H*-benzimidazol,
C. 5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]thio}-1*H*-benzimidazol (ufiprazol),
D. 5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl)methyl]sulfonyl}-1*H*-benzimidazol (omeprazolsulfon),
E. 5-methoxy-2-{[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridyl) methyl]sulfinyl}-1*H*-benzimidazol-1′-oxid.

Ononidis radix

N

Kořen jehlice trnité

Synonymum. Radix ononidis

Je to usušený kořen a oddenek druhu *Ononis spinosa agg.*

Vlastnosti

Droga slabého pachu, škrablavé, natrpklé chuti s nasládlou příchutí.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Oddenek krátký, většinou několikahlavý; kořen o průměru až 2 cm, většinou nevětvený, zkroucený, často ze stran smáčklý, svraskalý, zdřevnatělý a velmi tuhý. Oddenek i kořen na povrchu krytý šupinovitou šedohnědou až černohnědou borkou. Lom nepravidelný, vláknitý. Na rovném příčném řezu je patrna excentrická stavba kořene; kůra úzká, dřevo velmi široké, nažloutlé, dřeňové paprsky bílé, nestejně široké, vějířovité.

B. Droga se upráškuje (355). Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášek je šedobílý. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky kůry se ztlustlými nezdřevnatělými lýkovými vlákny; komůrková vlákna; obliterované sítkovice; úlomky dřeva se skupinami ztlustlých libriformních vláken; cévy schodovitě a síťovitě ztlustlé; úlomky parenchymu s krystaly šťavelanu vápenatého a malými, kulovitými škrobovými zrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (355) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 2 min na vodní lázni. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 40 mg *cholesterolu R* se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *lihu 96% R*, *toluenu R* a *chloroformu R* (10 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS1* a suší se 5 min až 10 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (onocerin) odpovídá přibližně polohou skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu jsou další méně intenzivně zbarvené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 2 % drogy na lomu ztmavlé.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

§§ Opium crudum

Surové opium

Synonymum. Opium

Surové opium je určeno výhradně jako výchozí surovina pro přípravu galenických přípravků. Samostatné se nesmí vydat.

Je to na vzduchu usušená mléčná šťáva získaná z druhu *Papaver somniferum* L. naříznutím nezralých plodů. Obsahuje nejméně 10,0 % morfinu ($C_{17}H_{19}NO_3$; M_r 285,34) a nejméně 2,0 % kodeinu ($C_{18}H_{21}NO_3$; M_r 299,37), počítáno na drogu vysušenou při 100 °C až 105 °C.

Vlastnosti

Jsou to černohnědé kusy charakteristického pachu, různé velikosti, které bývají měkké a lesklé, po usušení tvrdé a křehké.

Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

Odstraní se slupka, zkoušená látka se nakrájí na tenké plátky; je-li třeba, suší se 48 h při 60 °C a pak se upráškuje (500).

A. Pozoruje se pod mikroskopem. V suspenzi surového opia v roztoku *hydroxidu draselného R* (20 g/l) jsou patrna zrnka mléčné šťávy nahromaděná v neuspořádanou hmotu a světle hnědá protáhlá vlákna. Mohou být patrny úlomky cév a řidčeji i protáhlé, světlo lámající krystaly; stejně tak malý počet okrouhlých pylových zrn a úlomky protáhlých vláken. Mohou být přítomny ostře zašpičatělé chlupy různé délky a malé množství škrobových zrn zanesených v průběhu zpracování. Mohou být patrny úlomky epikarpu, tvořené mnohohrannými buňkami se stěnami ztlustlými a hvězdicovým luminem.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,10 g práškované drogy se rozetře s 5 ml *lihu* 70% *R (V/V)*, přidají se 3 ml *lihu* 70% *R (V/V);* směs se převede do kuželové baňky na 25 ml a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 50 °C až 60 °C za stálého míchání. Po ochlazení se zfiltruje, filtr se promyje *lihem* 70% *R (V/V)* a filtrát se jím zředí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 2,0 mg *papaveriniumchloridu R*, 12,0 mg *kodeiniumdihydrogenfosfatu R*, 12,0 mg *noskapiniumchloridu R* a 25,0 mg *morfiniumchloridu R* se rozpustí v *lihu* 70% *R (V/V)* a zředí se jím na 25,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R*, *acetonu R* a *toluenu R* (2 + 6 + 40 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS2* a pak roztokem *kyseliny sírové R* (4 g/l). Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou oranžově červené až červené skvrny; v dolní části skvrna odpovídající morfinu, nad ní podobně zbarvená skvrna odpovídající kodeinu, v horní části skvrna odpovídající papaverinu a nad ní skvrna odpovídající noskapinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; mezi skvrnami odpovídajícími kodeinu a papaverinu může být tmavě červená skvrna (thebain).

C. 1,0, g práškované drogy se protřepává 5 min s 5 ml *vody R* a pak se zfiltruje. Filtrát se smíchá s 0,25 ml *chloridu železitého RS2;* vznikne červené zbarvení, které se po přidání 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* nemění.

Zkoušky na čistotu

Thebain. Nejvýše 3,0 %, počítáno na vysušenou drogu. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. Připraví se způsobem popsaným ve Stanovení obsahu.
Porovnávací roztok. 25,0 mg *thebainu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Stanoví se způsobem popsaným ve Stanovení obsahu.

Zkoušku lze hodnotit, je-li hmotnostní rozdělovací poměr thebainu nejméně 3,0 a počet teoretických pater nejméně 3000. Obsah thebainu v procentech se vypočítá podle vzorce uvedeného ve Stanovení obsahu.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %, 1,000 g opia nařezaného na tenké plátky se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 1,00 g opia nakrájeného na tenké plátky se suspenduje v 50 ml *lihu* 50% *R (V/V)* a pomocí ultrazvuku se míchá 1 h; po ochlazení se zředí *lihem* 50 % *R (V/V)* na 100,0 ml a nechá se stát. 10,0 ml supernatantní tekutiny se smíchá s 5 ml *tlumivého roztoku s chloridem amonným o pH 9,5*, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a promíchá se. 20,0 ml tohoto roztoku se převede na chromatografický sloupec asi 150 mm dlouhý s vnitřním průměrem asi 30 mm naplněný 15 g *křemeliny pro chromatografii R*. Po 15 min se promyje dvakrát 40 ml směsi objemových dílů *2-propanolu R* a *dichlormethanu R* (15 + 85). Eluát se odpaří do sucha ve vakuu při 40 °C. Zbytek po odpaření se převede pomocí mobilní fáze do odměrné baňky a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,100 g *morfiniumchloridu R* a 25,0 mg *kodeinu R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- předkolony délky 40 mm a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je směsí připravenou následujícím způsobem: 1,0 g *monohydrát heptansulfonanu sodného R* se rozpustí ve 420 ml *vody R*, upraví se pH na hodnotu 3,2 roztokem *kyseliny fosforečné R* (4,9 g/l) (asi 5 ml) a smíchá se se 180 ml *acetonitrilu R*,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříknou se vhodné objemy zkoušeného a porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, není-li rozlišení mezi píky morfinu a kodeinu menší než 2,5. Je-li třeba, upraví se objem acetonitrilu v mobilní fázi. Porovnávací roztok se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, není-li relativní směrodatná odchylka plochy píku morfinu větší než 1,0 %. Nastřikuje se střídavě zkoušený roztok a porovnávací roztok.

Obsah jednotlivých alkaloidů v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{m_1 \,.\, A_2 \,.\, 625}{m_2 \,.\, A_1 \,.\, 5} \,.\, \frac{100}{100 - h},$$

v němž značí:

m_1 - navážku alkaloidu použitého k přípravě porovnávacího roztoku v gramech,
m_2 - navážku zkoušené látky použité k přípravě zkoušeného roztoku v gramech,
A_1 - plochu píku odpovídajícího alkaloidu na chromatogramu porovnávacího roztoku,
A_2 - plochu píku odpovídajícího alkaloidu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
h - ztrátu sušením v procentech.

1 mg *morfiniumchloridu R* odpovídá 0,759 mg morfinu a 1 mg *kodeinu R* odpovídá 0,943 mg kodeinu.

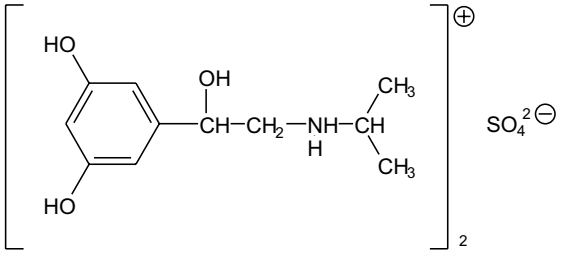
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněno před světlem.
Omamná látka.

†† Orciprenalini sulfas

Orciprenaliniumsulfat

Synonymum. Orciprenalinium sulfuricum



$C_{22}H_{36}N_2O_{10}S$ $_r$ 520,59 CAS 5874-97-5

Je to bis{(*RS*)-[2-hydroxy-2-(3,5-dihydroxyfenyl)ethyl]isopropylamonium}sulfat. Počítáno na bezvodou, rozpouštědel prostou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{22}H_{36}N_2O_{10}S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, slabě hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,04% (*V/V*) a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 240 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 278 nm. Specifická absorbance v maximu je 68,5 až 76,0, počítáno na bezvodou a rozpouštědel prostou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *orciprenaliniumsulfatu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně 50 mg zkoušené látky a referenční látky v co nejmenším množství *vody R,* přidá se 10 ml *acetonu R* a odstřeďuje se. Získané sraženiny se suší 3 h při 40 °C za sníženého tlaku a se zbytky se znovu zaznamenají spektra látek.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *orciprenaliniumsulfatu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *orciprenaliniumsulfatu CRL* a 10 mg *salbutamolu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% R*, *vody R* a *methanolu prostého aldehydu R* (1,5 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (10 g/l). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 20 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R.* Přidají se 2 ml roztoku *dichlorchinonchlorimidu R* (1 g/l) v *lihu 96% R* a 1 ml *uhličitanu sodného RS;* vznikne fialové zbarvení, které se mění na hnědé.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3).* 4,0 až 5,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 5) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 5) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 5) na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 9) na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztok a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R, 2-propanolu R* a *ethylacetatu R* (4 + 16 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a vystaví se účinku par jodu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je zřetelně viditelná.

Methanol a 2-propanol. Nejvýše 0,1 % methanolu a 0,3 % 2-propanolu. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *ethanolu R1* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 2 ml *ethanolu R1* se zředí *vodou R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Porovnávací roztok. Směs 1,0 ml *methanolu R* a 3,0 ml *2-propanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 140 °C a teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 180 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se ověří, že není přítomen žádný pík s retenčním časem stejným, jako má vnitřní standard. Vypočítá se obsah methanolu a 2-propanolu za použití hustoty při 20 °C, která je pro methanol 0,792 g/ml a 0,785 g/ml.

Fenon. 0,50 g se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,04% (*V/V*) a zředí se jím na 25,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 328 nm není větší než 0,16 (0,1 %).

Železo (*2.4.9*). Zbytek získaný ve zkoušce Síranový popel vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku železa (2 μg Fe/ml).*

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

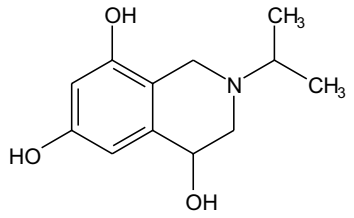
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 52,06 mg $C_{22}H_{36}N_2O_{10}S$.

Uchovávání

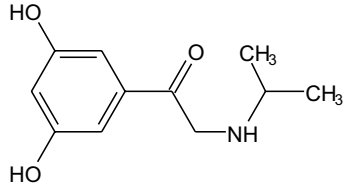
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

Nečistoty



A. 2-isopropyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-4,6,8-triol,

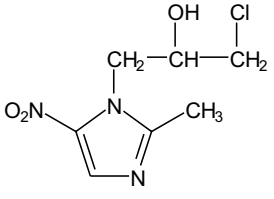


B. 1-(3,5-dihydroxyfenyl)-2-(isopropylamino)ethanon.

† Ornidazolum

N

Ornidazol



$C_7H_{10}ClN_3O_3$ M_r 219,63 CAS 16773-42-5

Je to 3-chlor-1-(2-methyl-5-nitroimidazolyl)-2-propanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_{10}ClN_3O_3$.

Vlastnosti

Bílý až nažloutlý krystalický prášek, na světle je nestálý. Je těžce rozpustný ve vodě a snadno rozpustný v lihu 96 %.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 85 °C až 90 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 200 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 230 nm a 312 nm. Specifická absorbance v maximu při 230 nm je 145 až 170 a v maximu při 312 nm je 380 až 420.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ornidazolu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Cizí organické látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,500 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Cizí organické látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,50 g *ornidazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *2-methyl-5-nitroimidazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml (roztok A). 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí methanolem na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku a 5 ml roztoku A připraveného u porovnávacího roztoku (b) se smíchají.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *kyseliny octové ledové R* a *chloroformu R* (5 + 10 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající 2-methyl-5-nitroimidazolu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy (*2.4.4*). 0,250 g se důkladně protřepe s 10 ml *vody R*, zfiltruje se a filtr se promyje dvakrát 2 ml *vody R*. Promývací tekutiny se spojí s filtrátem a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 3 h suší ve vakuu nad *silikagelem bezvodým R* při 60 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,96 mg $C_7H_{10}ClN_3O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 2-methyl-5-nitroimidazol.

Oryzae amylum

Rýžový škrob

Synonymum. Amylum oryzae

CAS 9005-25-8

Získává se z obilek druhu *Oryza sativa* L.

Vlastnosti

Velmi jemný bílý prášek vrzající při tření mezi prsty, bez chuti. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Pozoruje se pod mikroskopem. Mnohohranná zrna o průměru 2 μm až 5 μm, jednotlivá nebo shloučená do vejčitých útvarů o průměru 10 μm až 20 μm. Zrna bez soustředného vrstvení mají jen nezřetelnou středovou trhlinu. V polarizovaném světle se středová trhlina jeví jako černý kříž. Zrna s popraskanými nebo nepravidelnými okraji se vyskytují zcela výjimečně.

B. 1 g se suspenduje v 50 ml *vody R.* 1 min se povaří a pak se ochladí; vzniká řídký zakalený sliz.

C. K 1 ml slizu ze zkoušky totožnosti B se přidá 0,05 ml *jodu RS1;* vznikne tmavě modré zbarvení, které po zahřátí zmizí a po ochlazení se opět objeví.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 10 g se smíchá se 100 ml *lihu R* 70% *(V/V)* předem zneutralizovaného po přidání 0,5 ml *fenolftaleinu RS*, protřepává se 1 h a pak se zfiltruje. Ke změně zbarvení 50 ml filtrátu se spotřebují nejvýše 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Cizí příměsi. Mohou být přítomny pouze stopy buněčných stěn a protoplazmy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 aerobních bakterií a 10^2 plísní v gramu; stanoví se plotnovou metodou; vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* (*2.6.13*).

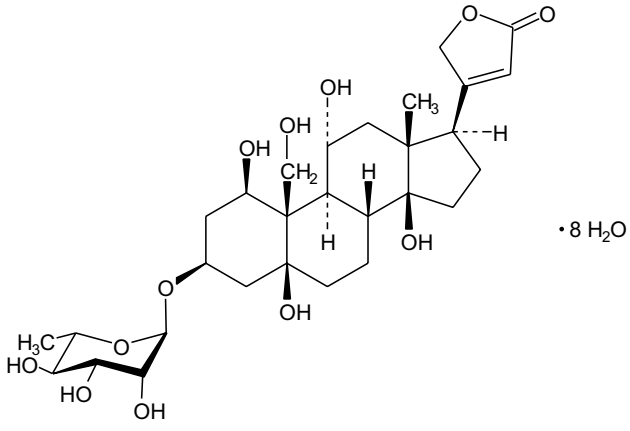
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

†† Ouabainum

Ouabain

Synonymum. *g*-Strophantinum



$C_{29}H_{44}O_{12}$. $8H_2O$ M_r 728,78 CAS 11018-89-6

M_r bezvodého 584,66

Je to oktahydrát 1β,5,11α,14,19-pentahydroxy-3β-(α-L-rhamnopyranosyloxy)-5β,14β-kard-20-(22)-enolidu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 104,0 % sloučeniny $C_{29}H_{44}O_{12}$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je mírně rozpustný ve vodě a v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru a v ethylacetatu.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

B. 2 mg až 3 mg se rozpustí ve 2 ml *kyseliny sírové R;* vzniká růžové zbarvení, které rychle přechází v červené. Roztok vykazuje v ultrafialovém světle zelenou fluorescenci.

C. Asi 1 mg se rozpustí v 1 ml *dinitrobenzenu RS* a přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vzniká intenzivní modré zbarvení.

D. 0,1 g se rozpustí v 5 ml roztoku *kyseliny sírové R* (150 g/l) a několik minut se vaří. Roztok zežloutne a zakalí se. Zfiltruje se, k filtrátu se přidá 5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (120 g/l), 3 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí zahřátím na vodní lázni v 15 ml *vody R*. Ochladí se a zředí se *vodou R* na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -30° až -33°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Množství zkoušené látky odpovídající 20 mg bezvodé látky se rozpustí v 1,0 ml směsi objemových dílů *vody R, chloroformu R* a *methanolu R* (32 + 100 + 100).
Porovnávací roztok (a). Množství *oubainu CRL* odpovídající 20 mg bezvodé látky se rozpustí v 1,0 ml směsi objemových dílů *vody R, chloroformu R* a *methanolu R* (32 + 100 + 100).
Porovnávací roztok (b). Množství *ouabainu CRL* odpovídající 10 mg bezvodé látky se rozpustí v 1,0 ml směsi objemových dílů *vody R, chloroformu R* a *methanolu R* (32 + 100 + 100) a zředí se stejnou směsí na 25 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *vody R, chloroformu R* a *methanolu R* (32 + 100 + 100) na 10 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se homogenní směsí objemových dílů *chloroformu R, methanolu R, dimethylsulfoxidu R* a *vody R* (70 + 15 + 15 + 4) po dráze 13 cm. Vrstva se suší 30 min v sušárně s odvětráváním při 140 °C. Po ochlazení se rovnoměrně postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 15 min při 140 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se vzdálily od startu natolik, aby vedlejší skvrny byly jednoznačně odděleny a skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) byla zřetelně viditelná.

Alkaloidy a strophanthin-K. K 5,0 ml roztoku S se přidá 0,5 ml roztoku *taninu R* (100 g/l); nevzniká žádná sraženina.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 18,0 % až 22,0 %; stanoví se s 0,100 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

40,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Připraví se porovnávací roztok stejným způsobem za použití 40,0 mg *ouabainu CRL*. K 5,0 ml obou roztoků se přidají 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS* a roztoky se nechají 30 min stát za chránění před přímým světlem a měří se absorbance (*2.2.25*) obou roztoků v maximu při 495 nm proti současně a stejným způsobem připravenému kontrolnímu roztoku, kterým je směs 5,0 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *trinitrofenolatu sodného RS.*

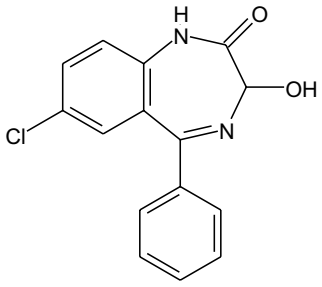
Obsah $C_{29}H_{44}O_{12}$ se vypočítá z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

§ Oxazepamum

Oxazepam



$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ $_r$ 286,72 CAS 604-75-1

Je to 5-fenyl-1,3-dihydro-3-hydroxy-7-chlor-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-on.
Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. *Roztoky se připraví bezprostředně před použitím za chránění před světlem.* 20,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml (roztok A). 10,0 ml roztoku A se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml (roztok B). Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku A při 300 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 316 nm. Měří se absorbance roztoku B při 220 nm až 250 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 229 nm. Hodnota specifické absorbance v maximu při 229 nm je 1220 až 1300.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *oxazepamu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 20 mg se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R,* 5 min se zahřívá k varu a ochladí se. Přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (1 g/l) a nechá se 1 min stát. Přidá se 1 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (5 g/l), promíchá se a nechá 1 min stát. Přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (1 g/l); vzniká červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za chránění před světlem*. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm. Před použitím se vrstva promývá *methanolem R*, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne nejméně 17 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a potom se 30 min zahřívá při 100 °C až 105 °C.

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *oxazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *oxazepamu CRL* a 10 mg *bromazepamu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 5 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se ve směru promývání *methanolem R* směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 90 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

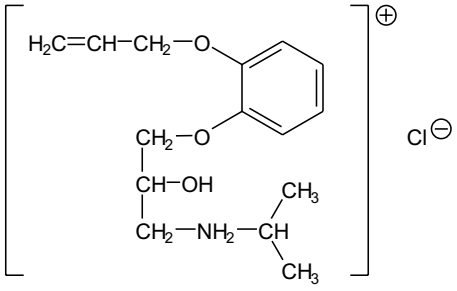
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,67 mg $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

† Oxprenololi hydrochloridum

Oxprenololiumchlorid



$C_{15}H_{24}ClNO_3$ $_r$ 301,81 CAS 6452-73-9

Je to (*RS*)-N-isopropyl-3-(2-allyloxyfenoxy)-2-hydroxypropylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{15}H_{24}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 107 °C až 110 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *oxprenololiumchloridu CRL*. Pokud se spektra získaná v pevném stavu u zkoušené látky a referenční látky liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *ethylacetatu R*, odpaří se do sucha a zaznamenají se nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ŽZ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,0; měří se čerstvě připravený roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 2,0 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9).
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *oxprenololiumchloridu CRL* se rozpustí ve 2,0 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9).
Porovnávací roztok (b). 0,4 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 µl každého roztoku, skvrny se suší na vzduchu po dobu 15 min a vyvíjí se ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (2 + 12 + 88) po dráze 13 cm. Potom se vrstva suší 10 min v proudu teplého vzduchu a po ochlazení se postříká *anisaldehydem RS*. Deska s vrstvou se zahřívá 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Olovo. Nejvýše 5 µg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrofotometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se zředěním 0,5 ml a 1,0 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml) vodou R* na 25,0 ml.

Měří se absorbance při 217,0 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 6 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 5 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,18 mg $C_{15}H_{24}ClNO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Oxygenum

1998

Kyslík

Synonymum. Oxygenium

O_2 $_r$ 32,00 CAS 7782-44-7

Obsahuje nejméně 99,5 % (*V/V*) O_2.

Vlastnosti

Bezbarvý plyn, bez pachu. Při 20 °C a tlaku 101 kPa se 1 objemový díl plynu rozpustí v asi 32 objemových dílech vody.

Výroba

Oxid uhličitý. Nejvýše 300 ml/m^3; stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.24)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.
Porovnávací plyn (a). Kyslík R.
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 300 ml/m^3 *oxidu uhličitého R1* v *dusíku R1*.

Přístroj se kalibruje za použití porovnávacích plynů (a) a (b) a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhličitého ve zkoušeném plynu.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití infračerveného analyzátoru *(2.5.25)*.

Zkoušený plyn. Zkoušená látka; musí být filtrována, aby se vyloučily efekty rozptýleného světla.
Porovnávací plyn (a). Kyslík R.
Porovnávací plyn (b). Směs obsahující 5 ml/m^3 *oxidu uhelnatého R* v *dusíku R1*.

Přístroj se kalibruje za použití porovnávacích plynů (a) a (b) a nastaví se citlivost. Změří se obsah oxidu uhelnatého ve zkoušeném plynu.

Voda. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití elektrolytického hygrometru *(2.5.28)*.

Stanovení obsahu. Stanoví se obsah kyslíku za použití paramagnetického analyzátoru *(2.5.27)*.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A a B, viz Obecné zásady (1.2).

A. Doutnající dřevěná tříska se umístí do atmosféry zkoušeného plynu; tříska vzplane.

B. Protřepává se s *pyrogallolem zásaditým RS;* zkoušený plyn je absorbován a roztok se zbarví tmavě hnědě.

C. Vyhovuje požadavkům zkoušky Stanovení obsahu.

Zkoušky na čistotu

Oxid uhličitý. Nejvýše 300 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhličitého *(2.1.6)*.

Oxid uhelnatý. Nejvýše 5 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci oxidu uhelnatého *(2.1.6)*.

Vodní pára. Nejvýše 60 ml/m^3; stanoví se za použití trubičky k detekci vodní páry *(2.1.6)*.

Uchovávání

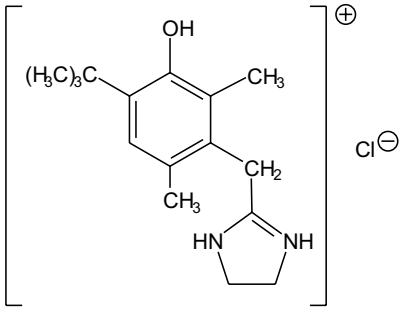
Pod tlakem jako plyn nebo kapalina ve vhodných obalech vyhovujících ČSN 07 8510. Kohouty a ventily se nepromazávají tukem ani olejem.

Nečistoty

A. oxid uhličitý,
B. oxid uhelnatý,
C. voda.

Oxymetazolini hydrochloridum

Oxymetazoliniumchlorid



$C_{16}H_{25}ClN_2O$ $_r$ 296,84 CAS 2315-02-8

Je to 2-(3-hydroxy-2,6-dimethyl-4-terc.butylbenzyl)-2-imidazoliniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{25}ClN_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *oxymetazoliniumchloridu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 2 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l), 0,2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a nechá se 10 min stát. Potom se přidají 2 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS;* vzniká fialové zabarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,40 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *oxymethazoliniumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *methanolu R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *ethylacetatu R* a *methanolu R* na 40 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *cyklohexanu R* a *ethanolu R* (6 + 15 + 79) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min v proudu teplého vzduchu, po ochlazení se postříká čerstvě připraveným roztokem *hexakyanoželezitanu draselného R* (5,0 g/l) v *chloridu železitém RS2* a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

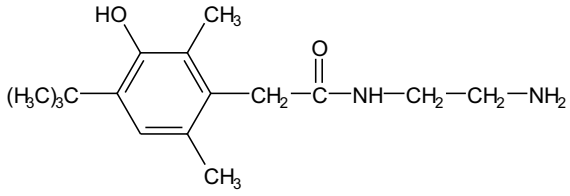
0,200 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 20 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,68 mg $C_{16}H_{25}ClN_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

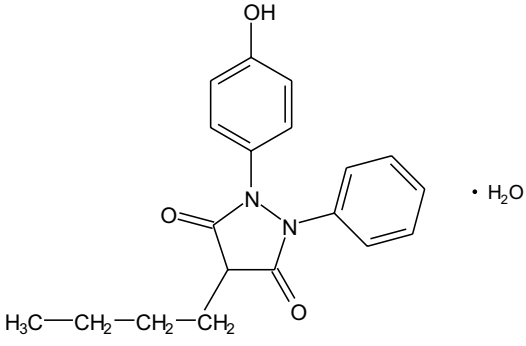
Nečistoty



A. N-(2-aminoethyl)-2-(3-hydroxy-2,6-dimethyl-4-terc.butylfenyl)acetamid.

† Oxyphenbutazonum

Oxyfenbutazon



$C_{19}H_{20}N_2O_3 \cdot H_2O$ M_r 342,39 CAS 7081-38-1

M_r bezvodého 324,38

Je to monohydrát 4-butyl-2-fenyl-1-(4-hydroxyfenyl)-3,5-pyrazolidindionu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{20}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a dobře rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,01 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm (*2.2.25*). Roztok vykazuje absorpční maximum při 254 nm. Specifická absorbance v maximu je 710 až 770.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *oxyfenbutazonu CRL*. Měří se roztoky látek (60 g/l) v *dichlormethanu R* v 0,1mm vrstvě.

C. Asi 20 mg se rozpustí ve 2 ml *lihu 96% R*. Přidají se 2 ml roztoku *dichlorchinonchlorimidu R* (1 g/l) v *lihu 96% R* a 1 ml *uhličitanu sodného RS;* vznikne intenzivně zelené zbarvení.

D. K 0,1 g se přidá 1 ml *kyseliny octové ledové R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidají 3 ml roztoku *dusitanu sodného R* (7 g/l); vzniká žluté zbarvení. K 1 ml tohoto roztoku se přidá roztok 10 mg *2-naftolu R* v 5 ml *uhličitanu sodného RS;* vznikne oranžová až oranžově červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 0,50 g se přidá směs 8 ml roztoku *glycinu R* (75 g/l) a 12 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*. Protřepává se 1 min a roztok se uchovává přesně 60 min při 25 °C a ihned se použije.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*).

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S měřená při 420 nm v 4cm vrstvě není větší než 0,40.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g látky se rozpustí v *ethanolu R*, který obsahuje 0,2 g/l *butylhydroxytoluenu R*, a zředí se na 5 ml stejným rozpouštědlem. Připraví se těsně před použitím.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *ethanolem R* obsahujícím 0,2 g/l *butylhydroxytoluenu R* na 200 ml. Připraví se těsně před použitím.

Vrstva se umístí do chromatografické komory obsahující mobilní fázi, kterou je směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *chloroformu R* (20 + 80), s obsahem 0,2 g/l *butylhydroxytoluenu R*. Vyvíjí se po dráze 4 cm a pak se vrstva vyjme a suší se 1 min v proudu studeného vzduchu. Na vrstvu se ihned nanese odděleně pod proudem *dusíku R* po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se ihned mobilní fází uvedenou výše po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 5,0 % až 6,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 25 ml *acetonu R*, přidá se 0,1 ml *modři bromthymolové RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do modrého zbarvení, které je stálé 15 s. Provede se slepá zkouška.

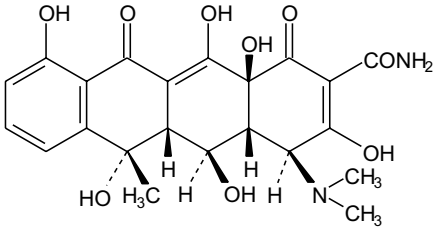
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,44 mg $C_{19}H_{20}N_2O_3$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Oxytetracyclinum

Oxytetracyklin



$C_{22}H_{24}N_2O_9$ M_r 460,44 CAS 79-57-2

Je to (4*S*,4a*R*,5*S*,5a*R*,6*S*,12a*S*)-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,5,6,10,12,12a--hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naftacenkarboxamid, látka produkovaná určitými kmeny *Streptomyces rimosus* nebo získaná jiným způsobem. Obsahuje proměnlivé množství vody. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{24}N_2O_9$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě. Rozpouští se ve zředěných kyselých a alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na hodnotu 7,0, asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm. Vrstva se nechá sušit nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *oxytetracyklinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *oxytetracyklinu CRL* a 5 mg *demeklocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vzniká temně červené zbarvení. Roztok se přidá k 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní ve žluté.

C. Asi 10 mg se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 5 ml *vody RS*. Protřepe se a přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2*. Opalescence roztoku není intenzivnější než opalescence směsi 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 5 ml *roztoku chloridu draselného R* (0,021 g/l) a 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 7,5; měří se suspenze 0,1 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -203° až -216°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 20,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku o pH 2,0* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem o pH 2,0* na 100,0 ml. Specifická absorbance při 353 nm je 290 až 310, počítáno na bezvodou látku.

Světlo absorbující nečistoty. 20,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se jí na 10,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) při 430 nm, počítaná na bezvodou látku, není vyšší než 0,25.

0,100 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se jí na 10,0 ml. Absorbance při 490 nm, počítaná na bezvodou látku, není vyšší než 0,20.

Měření se provedou do 1 h od přípravy roztoků.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříknou se zkoušený roztok a porovnávací roztok (e). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku odpovídajícího 4-epioxytetracyklinu nebo tetracyklinu větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,5 %). Na chromatogramu zkoušené látky plocha jakéhokoliv píku, který se objeví na sestupné části hlavního píku, není větší než čtyřnásobek plochy píku odpovídajícího 4-epioxytetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (2,0 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 4,0 % až 8,0 %; stanoví se s 0,250 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *oxytetracyklinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *4-epioxytetracyklinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (d). 1,5 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) a 3,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (e). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se smíchá se 4,0 ml porovnávacího roztoku (c) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm) a udržované při 60 °C,
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: naváží se 60,0 g *terc.butanolu R* a převede se do odměrné baňky na 1000 ml za pomoci 200 ml *vody R*. Přidá se 60 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,5* (0,33 mol/l), 50 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 7,5, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (0,4 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 7,5; zředí se *vodou R* na 1000 ml. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (d). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků nebyla menší než polovina celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (4-epioxytetracyklin) a druhým píkem (oxytetracyklin) je nejméně 4,0 a rozlišení mezi druhým píkem (oxytetracyklin) a třetím píkem (tetracyklin) je nejméně 5,0. Podle potřeby se přizpůsobí obsah terc.butanolu v mobilní fázi. Faktor symetrie druhého píku je nejvýše 1,25. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Obsah lze hodnotit pouze tehdy, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku oxytetracyklinu nejvýše 1,0 %. Podle potřeby se nastaví integrátor. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikují střídavě.

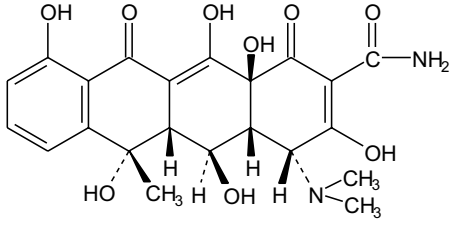
Obsah oxytetracyklinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

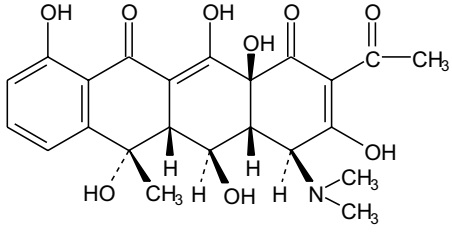
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty



A. 4-epioxytetracyklin,
B. tetracyklin,



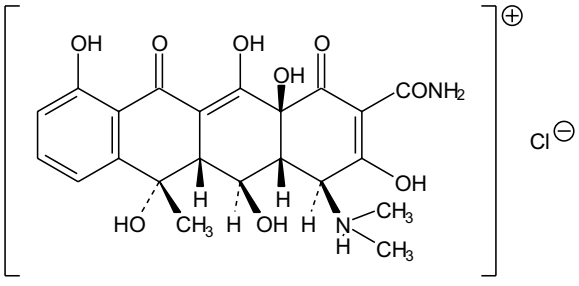
C. 2-acetyl-2-dekarboxamidooxytetracyklin.

† Oxytetracyclini hydrochloridum

1998

Oxytetracykliniumchlorid

Synonymum. Oxytetracyclinium chloratum



$C_{22}H_{25}ClN_2O_9$ $_r$ 496,90 CAS 2058-46-0

Je to (4*S*,4a*R*,5*S*,5a*R*,6*S*,12a*S*)-(1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12a-oktahydro-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-2--karbamoyl-6-methyl-1,11-dioxo-4-naftacenyl)dimethylamoniumchlorid, látka produkovaná určitými kmeny *Streptomyces rimosus* nebo získaná jiným způsobem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{25}ClN_2O_9$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%. Roztoky ve vodě se stáním kalí vlivem vysrážení oxytetracyklinu.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na hodnotu 7,0, asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm. Vrstva se nechá sušit nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *oxytetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *oxytetracykliniumchloridu CRL* a 5 mg *demeklocykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vznikne temně červené zbarvení. Roztok se přidá k 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní ve žluté.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,3 až 2,9; měří se následující roztok: 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -188° až -200°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 20,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku o pH 2,0* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem o pH 2,0* na 100,0 ml. Specifická absorbance při 353 nm je 270 až 290, počítáno na bezvodou látku.

Světlo absorbující nečistoty. 20,0 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se jí na 10,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) měřená při 430 nm a počítaná na bezvodou látku není větší než 0,50.

0,100 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se jí na 10,0 ml. Absorbance měřená při 490 nm a počítaná na bezvodou látku není vyšší než 0,20. Měření se provedou do 1 h od přípravy roztoků.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříknou se zkoušený roztok a porovnávací roztok (g). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku 4-epioxytetracyklinu nebo tetracyklinu větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (g) (0,5 %, event. 2,0 %) a celková plocha píků α-apo-oxytetracyklinu, β-apo-oxytetracyklinu a každého píku mezi těmito dvěma není větší než plocha píku β-apo-oxytetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (g) (2,0 %). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, který se objeví na sestupné části hlavního píku, větší než čtyřnásobek plochy píku 4-epioxytetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (g) (2,0 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %, provede se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,4 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 20,0 mg zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *oxytetracyklinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *4-epioxytetracyklinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 20,0 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 8,0 mg *α-apo-oxytetracyklinu CRL* se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l RS* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 8,0 mg *ß-apo-oxytetracyklinu CRL* se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l RS* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (f). 1,5 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (b), 3,0 ml porovnávacího roztoku (c), 3,0 ml porovnávacího roztoku (d) a 3,0 ml porovnávacího roztoku (e) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (g). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se smíchá se 4,0 ml porovnávacího roztoku (c) a 40,0 ml porovnávacího roztoku (e) a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 200,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm) a udržované při 60 °C,
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: naváží se 30,0 g (pro mobilní fázi A) nebo 100,0 g (pro mobilní fázi B) *terc.butanolu R* a přenese se do odměrných baněk na 1000 ml za pomoci 200 ml *vody R*. Do každé baňky se přidá 60 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,5* (0,33 mol/l), 50 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 7,5, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (0,4 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na 7,5. Oba roztoky se zředí *vodou R* na 1000 ml. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 μl,
- čerpadla dovolujícího gradientovou eluci.

Jednostupňová gradientová eluce se programuje takto: 15 min se čerpá směs objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (30 + 70) a poté 15 min směs objemových dílů mobilní fáze A a mobilní fáze B (30 + 70) a nakonec se ustálí první směsí.

Nastříkne se porovnávací roztok (f). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku nebyla menší než polovina celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (4-epioxytetracyklin) a druhým píkem (oxytetracyklin) je nejméně 4,0, rozlišení mezi druhým píkem (oxytetracyklin) a třetím píkem (tetracyklin) je nejméně 5,0 a rozlišení mezi čtvrtým píkem (α-apo-oxytetracyklin) a pátým píkem (ß-apo-oxytetracyklin) je nejméně 3,5. Faktor symetrie druhého píku je nejvýše 1,25. Podle potřeby se přizpůsobí poměr mobilní fáze A k mobilní fázi B použitý k vytvoření jednostupňové gradientové eluce nebo se upraví časový program. Porovnávací roztok (a) se nastříkne šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku oxytetracyklinu nejvýše 1,0 %. Podle potřeby se nastaví parametry integrátoru. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Obsah oxytetracykliniumchloridu se vypočítá v procentech; 1 mg oxytetracyklinu odpovídá 1,079 mg oxytetracykliniumchloridu.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

† Oxytocini solutio concentrata

1998

Koncentrovaný roztok oxytocinu

Je to roztok oxytocinu, cyklického nonapeptidu se strukturou hormonu produkovaného zadním lalokem hypofýzy. Stimuluje kontrakce dělohy a vylučování mléka u vnímavých savců. Získává se chemickou syntézou. Je to koncentrovaný roztok, jehož účinnost je nejméně 150 m.j. v mililitru. Obsahuje vhodnou protimikrobní konzervační látku, jako např. chlorbutanol v koncentraci 2 g/l. Specifická účinnost přípravku je nejméně 560 m.j. v miligramu peptidu stanoveného ve zkoušce Peptidy.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Zkoušky totožnosti

A. Vyvolává přiměřenou odpověď v podmínkách popsaných pod jednou z předepsaných metod pro stanovení účinnosti.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Peptidy, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Aminokyseliny. Stanoví se analyzátorem aminokyselin za použití *DL-norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se nastaví směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a L-forem následujících aminokyselin:

lysin	threonin	alanin	leucin
histidin	serin	valin	tyrosin
arginin	kyselina glutamová	methionin	fenylalanin
kyselina asparagová	prolin	isoleucin	

a polovinu ekvimolárního množství L-cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 30 mg *DL-norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. Množství přípravku odpovídající 1 mg peptidu se naváží do pečlivě vymyté zkumavky z tvrdého skla délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Odpaří se do sucha. Přidá se přesně odměřený objem roztoku vnitřního standardu obsahující takové množství DL-norleucinu, které odpovídá polovičnímu očekávanému množství molů oxytocinu. Zkumavka se vloží do mrazicí směsi při -5 °C, vytvoří se podtlak nepřevyšující 133 Pa a zataví se. Poté se 16 h zahřívá na 110 °C až 115 °C. Zkumavka se po ochlazení otevře a její obsah se převede do 10ml baňky pomocí pěti dávek *vody R* po 0,2 ml. Vysuší se za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R* a potom se tento postup ještě jednou opakuje. Zbytek se rozpustí ve vhodném tlumivém roztoku o pH 2,2 a zředí se jím na vhodný objem.

Do analyzátoru aminokyselin se přesně odměří vhodné množství zkoušeného roztoku tak, aby píky aminokyselin přítomných v největších množstvích zaujímaly většinu stupnice záznamu.

Obsah jednotlivých aminokyselin se vyjádří v molech. Relativní zastoupení aminokyselin se vypočítá z předpokladu, že jedna šestina součtu molů kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, prolinu, glycinu, isoleucinu a leucinu se rovná 1. Hodnoty pro jednotlivé aminokyseliny jsou v těchto rozmezích: kyselina asparagová 0,95 až 1,05; kyselina glutamová 0,95 až 1,05; prolin 0,95 až 1,05; glycin 0,95 až 1,05; leucin 0,90 až 1,10; isoleucin 0,90 až 1,10; tyrosin 0,7 až 1,05; polovina cystinu 1,4 až 2,1. Ostatní aminokyseliny jsou jen ve stopách. Stanovení lze hodnotit jen v případě, jestliže nalezený počet molů DL-norleucinu se po opravě na množství použitého roztoku neliší o více než ±5 % od množství přidaného ke zkoušené látce před hydrolýzou.

Příbuzné peptidy. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. Použije se zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok (a). Připraví se roztok, který obsahuje 0,8 mg *desmopresinu CRL* a 0,8 mg *oxytocinu CRL* v mililitru roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l).
Porovnávací roztok (b). 0,1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí roztokem *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l) na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l),
  - *mobilní fáze B* - směs stejných objemů *acetonitrilu R* a *vody R*,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm, s vhodnou průtokovou kyvetou.

Kolona se promývá do ustavení rovnováhy směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (30 + 70). Potom zkouška 30 min pokračuje gradientovou elucí při kontinuálním a lineárním zvyšování koncentrace mobilní fáze B o 1,0 % (*V/V*)/min. Poté se eluuje 15 min směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (30 + 70) k opětnému dosažení rovnováhy kolony.

Nastříkne se 25 μl porovnávacího roztoku (a) a určí se píky oxytocinu a desmopresinu (první pík a případně druhý pík). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem desmopresinu a píkem oxytocinu je nejméně 5,0.

Je-li třeba, zvláště je-li protimikrobní konzervační látka jiná než chlorbutanol, může se požadovaného rozlišení mezi oxytocinem a protimikrobní konzervační látkou dosáhnout buď změněním počátečních objemů mobilních fází A a B, nebo upravením profilu gradientu.

Nastříkne se 25 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se zjistí pík odpovídající oxytocinu, jehož poměr signálu k šumu není

menší než 20 a jehož plocha je v rozmezí 0,75 % až 1,25 % plochy píku oxytocinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Nastříkne se odděleně 25 μl zkoušeného roztoku a 25 μl porovnávacího roztoku (a). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla ani k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1 % plochy píku oxytocinu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního (oxytocin) píku a píku rozpouštědla nebo protimikrobní konzervační látky, větší než 3 % plochy píku oxytocinu; součet ploch takovýchto píků není větší než 10 % celkové plochy všech píků kromě plochy píku rozpouštědla nebo protimikrobní konzervační látky.

Peptidy. 90 % až 110 % deklarovaného obsahu oxytocinu, uvedeného v miligramech sloučeniny $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ na mililitr.

Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) za použití postupu popsaného ve zkoušce Příbuzné peptidy.

Zkoušený roztok. Použije se zkoušený přípravek.

Porovnávací roztok. 3,5 mg *oxytocinu CRL* se rozpustí v roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l) a zředí se jím na 10,0 ml.

Nastříkne se odděleně 25 μl porovnávacího roztoku a 25 μl zkoušeného roztoku. Obsah $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ se vypočítá z ploch píků na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a z deklarovaného obsahu *oxytocinu CRL.*

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 100 m.j. endotoxinu v 200 m.j. oxytocinu.

Stanovení účinnosti

Stanoví se porovnáním účinnosti zkoušené látky s účinností mezinárodního standardu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je oxytocinová účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je suchý syntetický oxytocinový peptid s lidským albuminem. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Stanovená účinnost je nejméně 90 % a nejvýše 111 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvýše 125 % deklarované účinnosti.

Stanovení účinnosti se provádí metodou A nebo metodou B.

Metoda A - Snížení krevního tlaku kohouta

Anestezuje se mladý zdravý dospělý kohout o hmotnosti 1,2 kg až 2,3 kg. Použije se anestezie, která dlouhodobě udržuje krevní tlak na konstantní výši. Obnaží se stehenní sval z jedné stehenní kosti (musculus gluteus primus) a vypreparuje se arteria ischiadica. Do ní se zavede kanyla a zaznamenává se krevní tlak vhodným lineárním zapisovačem. Kanylou zavedenou do podkřídlové žíly se rychle vstřikují ředění referenčního přípravku a zkoušeného přípravku.

Referenční přípravek a zkoušený přípravek se ředí bezprostředně před použitím roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby podávaný objem byl 0,1 ml až 0,5 ml. Vyberou se dvě dávky referenčního přípravku, které vyvolají zřetelné a rychlé, ne však největší snížení krevního tlaku. Obvykle jsou potřebné dávky mezi 20 milijednotkami a 100 milijednotkami. Vyberou se dvě dávky zkoušeného přípravku, které vyvolají reakci, jež je blízká reakci po referenčním přípravku, a poměr

mezi dávkami je stejný jako u referenčního přípravku. Tento poměr se udržuje konstantní po celou zkoušku. Dvě dávky referenčního přípravku a dvě dávky zkoušeného přípravku se podávají podle plánu náhodného pořadí nebo podle latinského čtverce až do dosažení nejméně šesti skupin po čtyřech měřeních. Interval mezi dvěma dávkami je konstantní a je mezi 3 min až 10 min a závisí na tom, jak rychle dochází k návratu krevního tlaku k výchozí hodnotě. Zvíře, které se rychle stane necitlivým k opakovaným podáním roztoků, se vyřadí a ve zkoušce nahradí jiným. Odpovědi na každou dávku se měří a výsledek se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

Metoda B - stahy potkaní dělohy

Potkaní samici o hmotnosti 120 g až 200 g se 18 h až 24 h před zkouškou nitrosvalově vstříkne 100 μg estradiolbenzoatu. Bezprostředně před zkouškou se vaginálním nátěrem zjistí, zda je zvíře v estru nebo preestru. Potkan se usmrtí a jeden děložní roh se zavěsí do lázně s roztokem následujícího složení:

	g/l	mmol/l
chlorid sodný	6,62	113,3
chlorid draselný	0,45	6,1
chlorid vápenatý	0,07	0,5
chlorid hořečnatý	0,10	0,5
hydrogenuhličitan sodný	2,56	30,5
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	0,29	0,8
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	0,03	0,2
glukosa bezvodá	0,50	2,8

Lázeň se udržuje při 32 °C nebo na jiné vhodné teplotě, kdy nedochází ke spontánním stahům a zůstává citlivost dělohy na přípravek. Roztok se okysličuje směsí 5 % oxidu uhličitého a 95 % kyslíku a zaznamenávají se svalové stahy vhodným přístrojem (např. pákou s konstantním napětím, jejíž protizávaží nepřesahuje 2 g) dávajícím lineární odpověď.

Referenční přípravek a zkoušený přípravek se zředí roztokem stejného složení, jaké má roztok v lázni. Vyberou se dvě dávky referenčního přípravku, které přidány do lázně vyvolají zřetelně rozdílné submaximální stahy. Obvykle jsou potřebné dávky mezi 10 mikrojednotkami a 50 mikrojednotkami v mililitru roztoku lázně. Vyberou se dvě dávky zkoušeného přípravku, které vyvolají reakci, jež je co nejvíce blízká reakci po referenčním přípravku, a poměr mezi dávkami je stejný jako u referenčního přípravku. Tento poměr se udržuje konstantní po celou zkoušku.

Do lázně se přidají podle plánu náhodného pořadí nebo podle latinského čtverce dvě dávky referenčního přípravku a dvě dávky zkoušeného přípravku až do dosažení nejméně šesti úplných skupin po čtyřech dávkách. Interval mezi dvěma dávkami je konstantní a je mezi 3 min až 10 min v závislosti na tom, jak rychle se sval zotaví. Když se dosáhne maxima stahů, nahradí se tekutina v lázni čerstvým roztokem. Měří se odpověď na každou dávku a výsledek se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

Uchovávání

Při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li přípravek sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v mezinárodních jednotkách v mililitru,
- koncentrace peptidu ($C_{43}H_{66}O_{12}S_2$) v miligramech na mililitr,
- zda je přípravek sterilní,
- zda je přípravek prostý bakteriálních endotoxinů,
- název protimikrobní konzervační látky.

† Oxytocinum

1998

Oxytocin

$C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ M_r 1007,19 CAS 50-56-6

Je to cyklický nonapeptid mající strukturu hormonu produkovaného zadním lalokem hypofýzy. Stimuluje kontrakce dělohy a vylučování mléka u vnímavých savců. Získává se chemickou syntézou. Je v lyofilizované formě a jeho specifická účinnost je nejméně 560 m.j. v miligramu peptidu stanoveného ve zkoušce Peptidy.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek.

Zkoušky totožnosti

A. Vyvolává přiměřenou odpověď v podmínkách popsaných pod jednou z předepsaných metod pro stanovení účinnosti.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Peptidy, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Aminokyseliny. Stanoví se analyzátorem aminokyselin za použití *DL-norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se nastaví směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a L-forem následujících aminokyselin:

lysin	threonin	alanin	leucin
histidin	serin	valin	tyrosin
arginin	kyselina glutamová	methionin	fenylalanin
kyselina asparagová	prolin	isoleucin	

a polovinu ekvimolárního množství L-cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 30 mg *DL-norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 1,0 mg zkoušené látky se naváží do pečlivě vymyté zkumavky z tvrdého skla délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Přidá se přesně odměřený objem roztoku vnitřního standardu obsahující takové množství DL-norleucinu, které odpovídá polovičnímu očekávanému množství molů zkoušené látky. Zkumavka se vloží do mrazicí směsi při -5 °C, vytvoří se podtlak nepřevyšující 133 Pa a zataví se. Poté se 16 h zahřívá na 110 °C až 115 °C. Zkumavka se po ochlazení otevře a její obsah se převede do 10ml baňky pomocí pěti dávek *vody R* po 0,2 ml. Vysuší se za sníženého tlaku nad *hydroxidem draselným R* a potom se tento postup ještě jednou opakuje. Zbytek se rozpustí ve vhodném tlumivém roztoku o pH 2,2 a zředí se jím na vhodný objem.

Do analyzátoru aminokyselin se přesně odměří vhodné množství zkoušeného roztoku tak, aby píky aminokyselin přítomných v největších množstvích zaujímaly většinu stupnice záznamu.

Obsahy jednotlivých aminokyselin se vyjádří v molech. Relativní zastoupení aminokyselin se vypočítá z předpokladu, že jedna šestina součtu molů kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, prolinu, glycinu, isoleucinu a leucinu se rovná 1. Hodnoty pro jednotlivé aminokyseliny jsou v těchto rozmezích: kyselina asparagová 0,95 až 1,05; kyselina glutamová 0,95 až 1,05; prolin 0,95 až 1,05; glycin 0,95 až 1,05; leucin 0,90 až 1,10; isoleucin 0,90 až 1,10; tyrosin 0,7 až 1,05; polovina cystinu 1,4 až 2,1. Ostatní aminokyseliny jsou jen ve stopách. Stanovení lze hodnotit jen v případě, jestliže nalezený počet molů DL-norleucinu se po opravě na množství použitého roztoku neliší o více než ±5 % od množství přidaného ke zkoušené látce před hydrolýzou.

Příbuzné peptidy. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 3,5 mg se rozpustí v roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného* (15,6 g/l) a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). Připraví se roztok, který obsahuje 0,8 mg *desmopresinu CRL* a 0,8 mg *oxytocinu CRL* v mililitru roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l).
Porovnávací roztok (b). 0,1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí roztokem *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l) na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlosí 1 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l),
  - *mobilní fáze B* - směs stejných objemů *acetonitrilu R* a *vody R*,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm, s vhodnou průtokovou kyvetou.

Kolona se promývá do ustavení rovnováhy směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (30 + 70). Potom zkouška 30 min pokračuje gradientovou elucí při kontinuálním a lineárním zvyšování koncentrace mobilní fáze B o 1,0 % (*V/V*)/min. Poté se eluuje 15 min směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (30 + 70) k opětnému dosažení rovnováhy kolony.

Nastříkne se 25 μl porovnávacího roztoku (a) a určí se píky oxytocinu a desmopresinu (první pík a případně druhý pík). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem desmopresinu a píkem oxytocinu není menší než 5,0.

Je-li třeba, může se požadovaného rozlišení dosáhnout buď změněním počátečních objemů mobilních fází A a B, nebo upravením profilu gradientu.

Nastříkne se 25 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) se zjistí pík odpovídající oxytocinu, jehož poměr signálu k šumu není

menší než 20 a jehož plocha je v rozmezí 0,75 % až 1,25 % plochy píku oxytocinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Nastříkne se odděleně 25 l zkoušeného roztoku a 25 l porovnávacího roztoku (a). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla ani k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1 % plochy píku oxytocinu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního (oxytocin) píku a píku rozpouštědla, větší než 3 % plochy píku oxytocinu; součet ploch takovýchto píků není větší než 10 % celkové plochy všech píků kromě plochy píku rozpouštědla.

Peptidy. 90 % až 110 % deklarovaného obsahu oxytocinu v miligramech sloučeniny $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$.

Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) za použití postupu popsaného ve zkoušce Příbuzné peptidy.

Zkoušený roztok. 3,5 mg se rozpustí v roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l) a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok. 3,5 mg *oxytocinu CRL* se rozpustí v roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (15,6 g/l) a zředí se jím na 10,0 ml.

Nastříkne se odděleně 25 l porovnávacího roztoku a 25 l zkoušeného roztoku. Obsah $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ se vypočítá z ploch píků na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a z deklarovaného obsahu *oxytocinu CRL.*

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 100 m.j. endotoxinu v 200 m.j. oxytocinu.

Stanovení účinnosti

Stanoví se porovnáním účinnosti zkoušené látky s účinností mezinárodního standardu nebo referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je oxytocinová účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je suchý syntetický oxytocinový peptid s lidským albuminem. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Stanovená účinnost je nejméně 90 % a nejvýše 111 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvýše 125 % deklarované účinnosti.

Stanovení účinnosti se provádí metodou A nebo metodou B.

Metoda A - snížení krevního tlaku kohouta

Anestezuje se mladý zdravý dospělý kohout o hmotnosti 1,2 kg až 2,3 kg. Použije se anestezie, která dlouhodobě udržuje krevní tlak na konstantní výši. Obnaží se stehenní sval z jedné stehenní kosti (musculus gluteus primus) a vypreparuje se arteria ischiadica. Do ní se zavede kanyla a zaznamenává se krevní tlak vhodným lineárním zapisovačem. Kanylou zavedenou do podkřídlové žíly se rychle vstřikují ředění referenčního přípravku a zkoušeného přípravku.

Referenční přípravek a zkoušený přípravek se ředí bezprostředně před použitím roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby podávaný objem byl 0,1 ml až 0,5 ml. Vyberou se dvě dávky referenčního přípravku, které vyvolají zřetelné a rychlé, ne však největší snížení krevního tlaku. Obvykle jsou potřebné dávky mezi 20 milijednotkami a 100 milijednotkami. Vyberou se dvě dávky zkoušeného přípravku, které vyvolají reakci, jež je blízká reakci po referenčním přípravku, a poměr

mezi dávkami je stejný jako u referenčního přípravku. Tento poměr se udržuje konstantní po celou zkoušku. Dvě dávky referenčního přípravku a dvě dávky zkoušeného přípravku se podávají podle plánu náhodného pořadí nebo podle latinského čtverce až do dosažení nejméně šesti skupin po čtyřech měřeních. Interval mezi dvěma dávkami je konstantní a je mezi 3 min až 10 min a závisí na tom, jak rychle dochází k návratu krevního tlaku k výchozí hodnotě. Zvíře, které se rychle stane necitlivým k opakovaným podáním roztoků, se vyřadí a ve zkoušce nahradí jiným. Odpovědi na každou dávku se měří a výsledek se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

Metoda B - stahy potkaní dělohy

Potkaní samici o hmotnosti 120 g až 200 g se 18 h až 24 h před zkouškou nitrosvalově vstříkne 100 μg estradiolbenzoatu. Bezprostředně před zkouškou se vaginálním nátěrem zjistí, zda je zvíře v estru nebo preestru. Potkan se usmrtí a jeden děložní roh se zavěsí do lázně s roztokem následujícího složení:

	g/l	mmol/l
chlorid sodný	6,62	113,3
chlorid draselný	0,45	6,1
chlorid vápenatý	0,07	0,5
chlorid hořečnatý	0,10	0,5
hydrogenuhličitan sodný	2,56	30,5
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	0,29	0,8
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	0,03	0,2
glukosa bezvodá	0,50	2,8

Lázeň se udržuje při 32 °C nebo na jiné vhodné teplotě, kdy nedochází ke spontánním stahům a zůstává citlivost dělohy na přípravek. Roztok se okysličuje směsí 5 % oxidu uhličitého a 95 % kyslíku a zaznamenávají se svalové stahy vhodným přístrojem (např. pákou s konstantním napětím, jejíž protizávaží nepřesahuje 2 g) dávajícím lineární odpověď.

Referenční přípravek a zkoušený přípravek se zředí roztokem stejného složení, jaké má roztok v lázni. Vyberou se dvě dávky referenčního přípravku, které přidány do lázně vyvolají zřetelně rozdílné submaximální stahy. Obvykle jsou potřebné dávky mezi 10 mikrojednotkami a 50 mikrojednotkami v mililitru roztoku lázně. Vyberou se dvě dávky zkoušeného přípravku, které vyvolají reakci, jež je co nejvíce blízká reakci po referenčním přípravku, a poměr mezi dávkami je stejný jako u referenčního přípravku. Tento poměr se udržuje konstantní po celou zkoušku.

Do lázně se přidávají podle plánu náhodného pořadí nebo podle latinského čtverce dvě dávky referenčního přípravku a dvě dávky zkoušeného přípravku až do dosažení nejméně šesti úplných skupin po čtyřech dávkách. Interval mezi dvěma dávkami je konstantní a je mezi 3 min až 10 min v závislosti na tom, jak rychle se sval zotaví. Když se dosáhne maxima stahů, nahradí se tekutina v lázni čerstvým roztokem. Měří se odpověď na každou dávku a výsledek se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

Uchovávání

Ve vzduchotěsném obalu při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v mezinárodních jednotkách na miligram,
- obsah peptidu ($C_{43}H_{66}O_{12}S_2$),
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

2372

Pancreatis pulvis

Pankreatin prášek

Synonymum. Pancreatinum

CAS 8049-47-6

Připravuje se z čerstvé nebo zmrazené slinivky břišní (pankreatu) savců. Látka obsahuje enzymy s proteolytickou, lipolytickou a amylolytickou účinností.

1 miligram látky obsahuje nejméně 1,0 Ph.Eur.j. celkové proteolytické účinnosti, 15 Ph.Eur.j. lipolytické účinnosti a 12 Ph.Eur.j. amylolytické účinnosti. Připravuje se za podmínek, které minimalizují stupeň mikrobiálního znečištění.

Vlastnosti

Slabě hnědý amorfní prášek. Je částečně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozetře s 10 ml *vody R* a nastaví se na hodnotu pH 8,0 přidáním *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* za použití *červeně kresolové RS* jako indikátoru. Suspenze se rozdělí na dvě stejné části (suspenze (a) a suspenze (b)). Suspenze (a) se povaří. Ke každé suspenzi se přidá několik částeček *červeně Kongo-fibrinu R*, zahřeje se na 38 °C až 40 °C a při této teplotě se udržuje 1 h. Suspenze (a) je bezbarvá nebo slabě růžová a suspenze (b) je zbarvena zřetelně více červeně.

B. 0,25 g se rozetře s 10 ml *vody R* a nastaví se na hodnotu pH 8,0 přidáním *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* za použití 0,1 ml *červeně kresolové RS* jako indikátoru. Suspenze se rozdělí na 2 stejné části (suspenze (a) a suspenze (b)). Suspenze (a) se povaří. 0,1 g *škrobu rozpustného R* se rozpustí ve 100 ml vroucí *vody R*, vaří se 2 min a po ochlazení se zředí *vodou R* na 150 ml. K 75 ml roztoku škrobu se přidá suspenze (a) a ke zbývajícím 75 ml se přidá suspenze (b). Každá směs se zahřeje na 38 °C až 40 °C a při této teplotě se udržuje 5 min.

K 1 ml každé směsi se přidá 10 ml *jodu RS2*. Směs s obsahem suspenze (a) je zbarvena intenzivně modrofialově; směs získaná se suspenzí (b) má zbarvení roztoku jodu.

Zkoušky na čistotu

Obsah tuku. V zařízení na extrakci se 1,0 g extrahuje 3 h *etherem petrolejovým R1*. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se suší 2 h při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 50 mg (5,0 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší 4 h ve vakuové sušárně při 60 °C při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^4 živých mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* (*2.6.13*).

Stanovení obsahu

Celková proteolytická účinnost. Stanoví se porovnáním množství peptidů, které se nevysrážejí roztokem *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l), uvolněných za min z roztoku kaseinového substrátu s množstvím peptidů uvolněných *pankreatinem práškem (proteasou) BRP* ze stejného substrátu a za stejných podmínek.

Roztok kaseinu. V 5 ml *vody R* se suspenduje množství *kaseinu BRP* odpovídající 1,25 g vysušené látky, přidá se 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a míchá se 1 min. (Obsah vody v *kaseinu BRP* se stanoví před provedením zkoušky zahříváním 4 h ve vakuu při 60 °C). Přidá se 60 ml *vody R* a míchá se elektromagnetickým míchadlem, až je roztok prakticky čirý. Pak se upraví pH na hodnotu 8,0 *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* nebo *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Roztok se použije v den přípravy.

Roztok enterokinasy. 50 mg *enterokinasy BRP* se rozpustí v *chloridu vápenatém 0,02 mol/l RS* a zředí se jím na 50,0 ml. Roztok se použije v den přípravy.

Zkoušená suspenze a porovnávací suspenze se připraví a jejich zředění se provede při 0 °C až 4 °C.

Zkoušená suspenze. 0,100 g zkoušené látky se roztírá 5 min s 25 ml *chloridu vápenatého 0,02 mol/l RS*, který se přidává postupně. Převede se kvantitativně do odměrné baňky a zředí se *chloridem vápenatým 0,02 mol/l RS* na 100,0 ml. K 10,0 ml této suspenze se přidá 10,0 ml roztoku enterokinasy a zahřívá se 15 min ve vodní lázni při (35 ± 0,5) °C. Pak se ochladí a zředí *tlumivým roztokem boritanovým o pH 7,5* při (5 ± 3) °C na koncentraci asi 0,065 Ph.Eur.j. celkové proteolytické účinnost v mililitru, počítáno na základě předem stanovené účinnosti.

Porovnávací suspenze. Připraví se suspenze *pankreatinu prášku (proteasy) BRP*, jak bylo popsáno u zkoušené suspenze, ale bez přidání enterokinasy, aby byla získána známá konečná koncentrace asi 0,065 Ph.Eur.j. na ml, počítáno na základě předem stanovené účinosti.

Zkumavky se označí dvojmo T, T_b, S_1, S_{1b}, S_2, S_{2b}, S_3, S_{3b}; jedna zkumavka se označí B.

Do zkumavek se přidá *tlumivý roztok boritanový o pH 7,5* takto:

- B: 3,0 ml,
- S_1 a S_{1b}: 2,0 ml,
- S_2 a S_{2b}, T a T_b: 1,0 ml.

Do zkumavek se dále přidá porovnávací suspenze takto:

- S_1 a S_{1b}: 1,0 ml,
- S_2 a S_{2b}: 2,0 ml,
- S_3 a S_{3b}: 3,0 ml.

Přidají se 2,0 ml zkoušené suspenze do zkumavek T a T_b.

Přidá se 5 ml roztoku *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l) do zkumavek B, S_{1b}, S_{2b}, S_{3b} a T_b a promíchá se zatřepáním.

Zkumavky a roztok kaseinu se umístí do vodní lázně při (35 ± 0,5) °C a do každé zkumavky se vloží skleněná tyčinka. Když je dosaženo tepelné rovnováhy, přidají se 2 ml roztoku kaseinu do zkumavek B, S_{1b}, S_{2b}, S_{3b} a T_b a promíchá se. V čase 0 se přidají postupně v intervalech 30 s 2,0 ml roztoku kaseinu do zkumavek S_1, S_2, S_3 a T. Po každém přidání se ihned promíchá. Přesně 30 min po přidání kaseinového roztoku (dodržují se pravidelné intervaly) se přidá 5,0 ml roztoku *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l) do zkumavek S_1, S_2, S_3 a T a promíchá se. Zkumavky se vyjmou z vodní lázně a ponechají se stát 20 min při teplotě místnosti.

Obsah každé zkumavky se dvakrát zfiltruje stejným vhodným filtračním papírem, který byl předtím promyt roztokem *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l) a potom *vodou R* a vysušen.

Vhodný filtrační papír vyhovuje následující zkoušce: zfiltruje se 5 ml roztoku *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l) kruhovým bílým filtračním papírem průměru 7 cm; absorbance (*2.2.25*) tohoto filtrátu měřená při 275 nm za použití nefiltrovaného roztoku *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l) jako kontrolní tekutiny nepřevyšuje hodnotu 0,04.

Schéma výše uvedených operací je uvedeno v tabulce.

Změří se absorbance (*2.2.25*) filtrátů při 275 nm, přičemž se použije filtrát získaný ze zkumavky B jako kontrolní tekutina.

Průměrné hodnoty absorbance filtrátů získané ze zkumavek S_1, S_2 a S_3 se korigují odečtením průměrných hodnot získaných jednotlivě pro filtráty ze zkumavek S_{1b}, S_{2b} a S_{3b}. Sestrojí se kalibrační křivka vynesením korigovaných hodnot absorbance proti objemu použité porovnávací suspenze.

Stanoví se účinnost zkoušené látky za použití korigované absorbance pro zkoušenou suspenzi ($T - T_b$) a kalibrační křivky, přičemž je třeba vzít v úvahu zřeďovací faktory.

Zkoušku lze hodnotit, pokud jsou korigované hodnoty absorbance v rozmezí 0,15 až 0,60.

	Zkumavky								
	S_1	S_{1b}	S_2	S_{2b}	S_3	S_{3b}	T	T_b	B
tlumivý roztok	2	2	1	1			1	1	3
porovnávací roztok	1	1	2	2	3	3			
zkouška suspenze							2	2	
roztok kyseliny trichloroctové		5		5		5		5	5
smíchat		+		+		+		+	+
vodní lázeň 35 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
roztok kaseinu		2		2		2		2	2
smíchat		+		+		+		+	+
roztok kaseinu	2		2		2		2		
smíchat	+	+	+		+		+		
vodní lázeň 35 °C 30 min	+		+	+	+	+	+	+	+
roztok kyseliny trichloroctové	5		5		5		5		
smíchat	+		+		+		+		
teplota místnosti 20 min	+	+	+	+	+	+	+	+	+
filtrace	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lipolytická účinnost. Stanoví se porovnáváním rychlosti, při níž suspenze pankreatinu prášku hydrolyzuje substrát - emulzi olivového oleje, s rychlostí, při níž suspenze *pankreatinu prášku (amylasa a lipasa) BRP* hydrolyzuje stejný substrát za stejných podmínek. *Zkouška se provede v dusíkové atmosféře.*

Zásobní emulze olivového oleje. Do kádinky na 800 ml o průměru 9 cm se převede 40 ml *oleje olivového R*, 330 ml *arabské klovatiny RS* a 30 ml *vody R*. Na dno kádinky se umístí elektrický mixér a kádinka se vloží do nádoby obsahující *líh 96% R* a dostatečné množství ledu jako chladicí směsi. Emulguje se za použití mixéru průměrnou rychlostí 1000 ot./min až 2000 ot./min. Ochladí se na 5 °C až 10 °C a rychlost mixování se zvýší na 8000 ot./min. Mixuje se 30 min, přičemž se teplota udržuje pod 25 °C neustálým přidáváním rozmělněného ledu do chladicí směsi. (Vhodná je též směs chloridu vápenatého a rozmělněného ledu.) Zásobní emulze se uchovává v chladničce a použije se do 14 dnů. Emulze se nesmí rozpadnout do dvou vrstev. Průměr částeček emulze se

kontroluje pod mikroskopem. Alespoň 90 % má průměr pod 3 μm a žádná nemá průměr větší než 10 μm. Emulze se důkladně protřepe před přípravou emulzního substrátu.

Emulze olivového oleje. Pro 10 stanovení se smíchají následující roztoky v uvedeném pořadí: 100 ml zásobní emulze, 80 ml *trometamolu RS1*, 20 ml čerstvě připraveného roztoku *sodné soli taurocholanu BRP* (80 g/l) a 95 ml *vody R*. Použije se v den přípravy.

Zařízení. Použije se reakční nádoba objemu asi 50 ml opatřená:
- přístrojem, který udrží teplotu na (37 ± 0,5) °C,
- elektromagnetickou míchačkou,
- víčkem s otvory pro vložení elektrod, pro přítok byretou, pro trubičky pro přívod dusíku a pro přidávání zkoumadel.

Může být použito titrační zařízení manuální nebo automatické. V případě zařízení manuálního je byreta dělena po 0,005 ml a pH-metr je vybaven stupnicí s velkým měřicím rozsahem a skleněnou a kalomelovou elektrodou. Po každém stanovení se reakční nádoba vyprázdní odsátím a promyje se několikrát *vodou R*, přičemž se zbytky tekutiny po výplachu odstraňují odsátím.

Zkoušená suspenze. V malé třence ochlazené na 0 °C až 4 °C se pečlivě roztírá množství zkoušené látky ekvivalentní asi 2500 Ph.Eur.j. lipolytické účinnosti s 1 ml vychlazeného *tlumivého roztoku maleinanového o pH 7,0* (rozpouštědlo lipasy), až se získá velmi jemná suspenze. Ta se pak naředí chladným *tlumivým roztokem maleinanovým o pH 7,0*, převede se kvantitativně do odměrné baňky na 100,0 ml a zředí se po značku chladným tlumivým roztokem. Během titrace se baňka se zkoušenou suspenzí uchovává ve vodě s ledem.

Porovnávací suspenze. Aby se vyloučila absorpce vody vytvořené kondenzací, otevře se nádoba, až když porovnávací přípravek dosáhne teploty místnosti. Suspenze *pankreatinu prášku (amylasa a lipasa) BRP* se připraví, jak je popsáno u zkoušené suspenze, přičemž se použije množství odpovídající asi 2500 Ph.Eur.j.

Titrace se provede ihned po přípravě zkoušené suspenze a porovnávací suspenze. Do reakční nádobky vytemperované na (37 ± 0,5) °C se převede 29,5 ml emulze olivového oleje, nádobka se opatří míchadlem, elektrodami a byretou (její špička je ponořena do emulze olivového oleje).

Nádobka se uzavře víkem a zapne se přístroj. Opatrně se přidává za stálého míchání *hydroxid sodný 0,1 mol/l VS*, až je dosaženo pH 9,2. Za použití rychle tekoucí dělené pipety se přidá asi 0,5 ml předem zhomogenizované porovnávací suspenze, spustí se stopky a kontinuálně se přidává *hydroxid sodný 0,1 mol/l VS*, aby se udrželo pH na hodnotě 9,0. Přesně po 1 min se odečte spotřeba roztoku *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Toto měření se provede ještě čtyřikrát. První hodnota se nepoužije a z dalších čtyř odečtení se vypočte průměr (S_1). Provedou se další dvě stanovení (S_2 a S_3). Vypočte se průměr hodnot S_1, S_2 a S_3. Průměrná spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* by měla být asi 0,12 ml/min s limity 0,08 ml/min až 0,16 ml/min.

Stejným způsobem se provedou tři stanovení se zkoušenou suspenzí (T_1, T_2 a T_3). Je-li spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* mimo limity 0,08 ml/min až 0,16 ml/min, stanovení se opakuje s množstvím zkoušené suspenze, které je vhodnější, avšak v rozmezí mezi 0,4 ml a 0,6 ml. Jinak se přizpůsobí množství zkoušené látky tak, aby vyhovovalo podmínkám zkoušky. Vypočítá se průměr hodnot T_1, T_2 a T_3.

Účinnost v Ph.Eur.j. na mg se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{n \cdot m_1}{n_1 \cdot m} \cdot A ,$$

v němž značí:
n - průměrnou spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za min při titraci zkoušené suspenze,
n_1 - průměrnou spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za min při titraci porovnávací suspenze,
m - hmotnost zkoušené látky v miligramech,
m_1 - hmotnost porovnávacího přípravku v miligramech,
A - účinnost *pankreatinu prášku (amylasa a lipasa) BRP* v Ph.Eur.j. v miligramu.

Amylolytická účinnost. Stanoví se porovnáním rychlosti, při níž suspenze pankreatinu prášku hydrolyzuje substrát - roztok škrobu, s rychlostí, při níž suspenze *pankreatinu prášku (amylasa a lipasa) BRP* hydrolyzuje stejný substrát za stejných podmínek.

Roztok škrobu. K množství *škrobu BRP* odpovídajícímu 2,0 g vysušené látky se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se. (Obsah vody ve *škrobu BRP* se stanoví před zkouškou sušením 4 h při 120 °C.) Tato suspenze se za stálého míchání přidává ke 160 ml vroucí *vody R*. Nádoba se promyje několikrát postupně vždy 10 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá k horkému roztoku škrobu. Zahřeje se za stálého míchání k varu. Ochladí se na teplotu místnosti a zředí se *vodou R* na 200 ml. Roztok se použije v den přípravy.
Zkoušená suspenze. Množství zkoušené látky odpovídající asi 1500 Ph.Eur.j. amylolytické účinnosti se roztírá 15 min s 60 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,8 (1)*. Převede se kvantitativně do odměrné baňky a zředí se *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 6,8 (1)* na 100,0 ml.
Porovnávací suspenze. Připraví se suspenze *pankreatinu prášku (amylasa a lipasa) BRP*, jak je popsáno pro zkoušenou suspenzi, za použití množství odpovídajícího asi 1500 Ph.Eur.j.

Do zkumavky dlouhé 200 mm o průměru 22 mm se zabroušenou zátkou se převede 25,0 ml roztoku škrobu, 10,0 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,8 (1)* a 1,0 ml roztoku *chloridu sodného R* (11,7 g/l). Zkumavka se uzavře, protřepe a umístí se do vodní lázně při (25,0 ± 0,1) °C. Když nastane vyrovnání teploty, přidá se 1,0 ml zkoušené suspenze a spustí se stopky. Promíchá se a zkumavka se dá do vodní lázně. Přesně po 10 min se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. Směs se převede kvantitativně do kuželové baňky na 300 ml se zabroušenou zátkou. Za stálého míchání se přidá 10,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a ihned 45 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS*. Nechá se stát v temnu 15 min při teplotě 15 °C až 25 °C. Přidají se 4 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (1 + 4). Nadbytek jodu se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití mikrobyrety. Provede se slepá zkouška za přidání 2 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* před podáním zkoušené suspenze. Stejným způsobem se provede titrace porovnávací suspenze.

Amylolytická aktivita v Ph.Eur.j. na miligram se vypočte ze vztahu:

$$\frac{(n' - n) \cdot m_1}{(n_1' - n_1) \cdot m} \cdot A ,$$

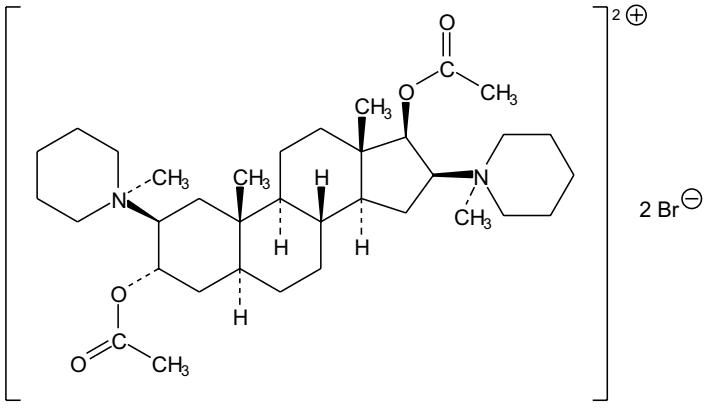
v němž značí:
n - spotřebu *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* při titraci zkoušené suspenze v mililitrech,
n_1 - spotřebu *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* při titraci porovnávací suspenze v mililitrech,
n' - spotřebu *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* při slepé zkoušce zkoušené suspenze v mililitrech,
n_1' - spotřebu *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* při slepé zkoušce porovnávací suspenze v mililitrech,
m - hmotnost zkoušené látky v miligramech,
m_1 - hmotnost porovnávacího přípravku v miligramech,
A - účinnost *pankreatinu prášku (amylasa a lipasa) BRP* v Ph.Eur.j. v miligramu.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 15 °C.

† Pancuronii bromidum

Pankuroniumbromid



$C_{35}H_{60}Br_2N_2O_4$ M_r 732,68 CAS 15500-66-0

Je to 1,1′-(3α,17β-diacetoxy-5α-androstan-2β,16β-diyl)bis(1-methylpiperidinium)dibromid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{35}H_{60}Br_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný nebo snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *pankuroniumbromidu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +38° až +42°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,75 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu. *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *pankuroniumbromidu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,1 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *dakuroniumbromidu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *pankuroniumbromidu CRL* se rozpustí v 1 ml porovnávacího roztoku (c).

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů roztoku *jodidu sodného R* (200 g/l), *acetonitrilu R* a *2-propanolu R* (5 + 10 + 85) po dráze 12 cm. Vrstva se vysuší v proudu studeného vzduchu a postříká roztokem *dusitanu sodného R* (10 g/l) v *methanolu R*. Po 2 min se postříká *jodobismutitanem draselným RS* a vysuší se v proudu studeného vzduchu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající dakuroniumbromidu není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající dakuroniumbromidu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny; hodnota R_F *dakuroniumbromidu CRL* vztažená k hodnotě $_FR$ *pankuroniumbromidu CRL* je nejméně 1,2 a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je zřetelně viditelná skvrna.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2000 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalemce (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,63 mg $C_{35}H_{60}Br_2N_2O_4$.

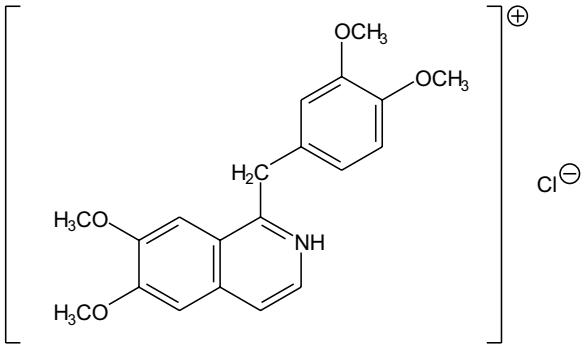
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Papaverini hydrochloridum

Papaveriniumchlorid

Synonymum. Papaverinium chloratum



$C_{20}H_{22}ClNO_4$ M_r 375,85 CAS 61-25-6

Je to 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxyisochinoliniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{22}ClNO_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bílé nebo téměř bílé krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 25 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 250,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 230 nm až 270 nm (*2.2.25*); roztok vykazuje absorpční maximum při 250 nm. Specifická absorbance v maximu je 1590 až 1670. 10,0 ml prvního roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance při 270 nm až 350 nm, roztok vykazuje dvě maxima, při 280 nm až 290 nm a při 303 nm až 313 nm. Specifické absorbance v maximech jsou 140 až 200 a 200 až 250.

B. K 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá několik kapek *amoniaku 17,5% RS* a nechá se stát. Promytá a vysušená sraženina taje (*2.2.14*) při 146 °C až 149 °C.

C. K asi 10 mg se přidají 3 ml *acetanhydridu R* a opatrně 0,15 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se na vodní lázni 3 min až 4 min; vzniká žluté zbarvení se zelenou fluorescencí.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

E. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,4 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 4,0; měří se roztok S.

Snadno zuhelnitelné látky. K 50 mg se přidá 5 ml *kyseliny sírové R* a nechá se 15 min stát. Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Č_4$ nebo $Ž_4$ (*2.2.2, Metoda I*).

Cizí alkaloidy. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,5 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *kodeinu R* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R, ethylacetatu R* a *toluenu R* (10 + 20 + 70) po dráze 15 cm. Deska s vrstvou se zahřívá, až není cítit pach diethylaminu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %). Nepřihlíží se ke skvrně, která zůstane na startu.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem ze zkoušky Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 6 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

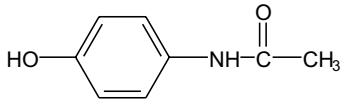
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,59 mg $C_{20}H_{22}ClNO_4$.

Uchovávání

Separandum.

Paracetamolum

Paracetamol



$C_8H_9NO_2$ M_r 151,16 CAS 103-90-2

Je to 4′-hydroxyacetanilid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_9NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 168 °C až 172 °C.

B. 50 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. K 1,0 ml roztoku se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml. Roztok se chrání před světlem a měří se ihned po jeho přípravě absorbance (*2.2.25*) v absorpčním maximu při 249 nm. Specifická absorbance v maximu je 860 až 980.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *paracetamolu CRL*.

D. K 0,1 g se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 3 min se zahřívá k varu, přidá se 10 ml *vody R* a ochladí se; nevznikne sraženina. Přidá se 0,05 ml *dichromanu draselného 0,0167 mol/l RS;* vzniká fialové zbarvení, které se nemění na červené.

E. Vyhovuje zkoušce na acetyl (*2.3.1*). Zahřívá se nad přímým plamenem.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g jemně upráškované zkoušené látky se naváží do 15ml skleněné nebo polytetrafluorethylenové centrifugační zkumavky s uzávěrem a přidá se 5,0 ml *etheru prostého peroxidu R*. Zkumavka se uzavře a obsah se 30 min mechanicky třepe, odstřeďuje se 15 min nebo do získání čiré supernatantní tekutiny.
Zkoušený roztok (b). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 4,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *chloracetanilidu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 8,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,25 g *chloracetanilidu R* a 0,1 g zkoušené látky se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 200 μl zkoušeného roztoku (a), 20 μl porovnávacího roztoku (a), 20 μl zkoušeného roztoku (b), 20 μl porovnávacího roztoku (b) a 20 μl porovnávacího roztoku (c) a ihned se vyvíjí v nenasycené komoře směsí objemových dílů *methanolu R, 1,1,1-trichlorethanu R* a *diisopropyletheru R* (10 + 40 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající chloracetanilidu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,005 %). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b), kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající chloracetanilidu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

4-Aminofenol. 0,50 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml. Přidá se 0,2 ml čerstvě připraveného roztoku obsahujícího *nitroprussid sodný R* (10 g/l) a *uhličitan sodný bezvodý R* (10 g/l), promíchá se a nechá se 30 min stát. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 10,0 ml směsi *methanolu R* a *vody R* obsahující 0,50 g *paracetamolu prostého 4-aminofenolu R* a 0,5 ml roztoku *4-aminofenolu R* (0,05 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R*. Případné modré zbarvení zkoušeného roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku (50 μg/g)

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85) a zředí se stejnou směsí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 μg/g). Jako porovnávací roztok se použije roztok olova (1 μg Pb/ml) připravený zředěním základního *roztoku olova (100 μg Pb/ml)* stejnou směsí *vody R* a *acetonu R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 30 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. 1 h se vaří pod zpětným chladičem, ochladí se a zředí se *vodou R* na 100 ml. K 20,0 ml tohoto roztoku se přidá 40 ml *vody R*, 40 g ledu, 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,1 ml *feroinu RS* a titruje se *tetrasulfatoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do žlutého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrasulfatoceričitanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 7,56 mg $C_8H_9NO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Paraffinum liquidum

Tekutý parafin

CAS 8012-95-1

Je to čištěná směs tekutých nasycených uhlovodíků získaných z ropy.

Vlastnosti

Bezbarvá průsvitná olejovitá kapalina, téměř bez chuti. V denním světle nejeví fluorescenci. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etheru a v uhlovodících, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml se přidá 20 ml vroucí *vody R* a silně se 1 min třepe. Po ochlazení se vodná vrstva oddělí a zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,827 až 0,890.

Viskozita *(2.2.8)*. 110 mPa.s až 230 mPa.s.

Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Použijí se zkoumadla pro spektrofotometrii.* 25,0 ml se převede do dělicí nálevky na 125 ml s nenamazanými zabroušenými částmi (zátka, uzavírací kohout) a přidá se 25 ml *hexanu R* (před použitím se hexan dvakrát protřepe s pětinou svého objemu *dimethylsulfoxidu R*). Po promíchání se přidá 5,0 ml *dimethylsulfoxidu R*, silně se 1 min třepe a nechá se stát, dokud se nevytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vrstva se převede do druhé dělicí nálevky, přidají se 2 ml *hexanu R* a směs se silně protřepe. Nechá se stát, dokud se nevytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vrstva se oddělí a měří se absorbance *(2.2.25)* při 260 nm až 420 nm za použití kontrolní tekutiny, kterou je spodní vrstva získaná silným třepáním 5,0 ml *dimethylsulfoxidu R* s 25 ml *hexanu R* po dobu 1 min. Připraví se porovnávací roztok *naftalenu R* (7,0 mg/l) v *trimethylpentanu R* a měří se absorbance v maximu při 275 nm za použití *trimethylpentanu R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance zkoušeného roztoku měřená při 260 nm až 420 nm není při žádné vlnové délce větší než jedna třetina absorbance porovnávacího roztoku při 275 nm.

Snadno zuhelnitelné látky. Do zkumavky se zabroušenou zátkou asi 125 mm dlouhé o vnitřním průměru 18 mm dělené na 5 ml a 10 ml, umyté *kyselinou chromsírovou R*, vypláchnuté *vodou R* a vysušené se dá 5 ml zkoušené látky. Přidá se 5 ml *kyseliny sírové prosté dusíku R* (95,0% až 95,5% H_2SO_4), uzavře se a silně, jak je možné, se ve směru podélné osy zkumavky po dobu 5 s třepe. Zkumavka se otevře a ihned se umístí do vodní lázně tak, aby se nedotýkala dna nebo stěn lázně, a zahřívá se 10 min. Po 2 min, 4 min, 6 min a 8 min se zkumavka vyjme z vodní lázně a 5 s se silně třepe ve směru podélné osy zkumavky. Na konci desetiminutového zahřívání se zkumavka vyjme z lázně, nechá se stát 10 min a potom se 5 min centrifuguje při 2000 g_n. 4 ml horní vrstvy se převedou do čisté zkumavky. Roztok není intenzivněji zbarven *(2.2.2, Metoda I)* než 4 ml směsi 0,6 ml základního modrého roztoku a 9,4 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l). Spodní vrstva není intenzivněji zbarvena *(2.2.2, Metoda I)* než směs 0,5 ml základního modrého roztoku, 1,5 ml základního červeného roztoku, 3,0 ml základního žlutého roztoku a 2 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l).

Pevné parafiny. Zahřívá se vhodné množství zkoušené látky při 100 °C po dobu 2 h, ochladí se v exsikátoru nad *kyselinou sírovou R*. Převede se do skleněné zkumavky s vnitřním průměrem asi 25 mm, zkumavka se uzavře a ponoří se do vody s ledem. Po 4 h je tekutina čirá tak, že 0,5 mm silná čára na bílém pozadí umístěná vertikálně za zkumavkou je jasně viditelná.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Paraffinum perliquidum

Lehký tekutý parafin

CAS 8012-95-1

Je to čištěná směs tekutých nasycených uhlovodíků získaných z ropy.

Vlastnosti

Bezbarvá průsvitná olejovitá tekutina, téměř bez chuti. V denním světle nejeví fluorescenci. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etheru a v uhlovodících, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml se přidá 20 ml vroucí *vody R* a silně se 1 min třepe. Po ochlazení se vodná vrstva oddělí a zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,810 až 0,875.

Viskozita *(2.2.8)*. 25 mPa.s až 80 mPa.s (25 cP až 80 cP).

Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Použijí se zkoumadla pro spektrofotometrii.* 25,0 ml se převede do dělicí nálevky na 125 ml s nenamazanými zabroušenými částmi (zátka, uzavírací kohout) a přidá se 25 ml *hexanu R* (před použitím se hexan dvakrát protřepe s pětinou svého objemu *dimethylsulfoxidu R*). Po promíchání se přidá 5,0 ml *dimethylsulfoxidu R*, silně se 1 min třepe a nechá se stát, dokud se nevytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vrstva se převede do druhé dělicí nálevky, přidají se 2 ml *hexanu R* a směs se silně protřepe. Nechá se stát, dokud se nevytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vrstva se oddělí a měří se absorbance *(2.2.25)* při 260 nm až 420 nm za použití kontrolní tekutiny, kterou je spodní vrstva získaná silným třepáním 5,0 ml *dimethylsulfoxidu R* s 25 ml *hexanu R* po dobu 1 min. Připraví se porovnávací roztok *naftalenu R* (7,0 mg/l) v *trimethylpentanu R* a měří se absorbance v maximu při 275 nm za použití *trimethylpentanu R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance zkoušeného roztoku měřená při 260 nm až 420 nm není při žádné vlnové délce větší než jedna třetina absorbance porovnávacího roztoku při 275 nm.

Snadno zuhelnitelné látky. Do zkumavky se zabroušenou zátkou asi 125 mm dlouhé o vnitřním průměru 18 mm dělené na 5 ml a 10 ml, umyté *kyselinou chromsírovou R*, vypláchnuté *vodou R* a vysušené se dá 5 ml zkoušené látky. Přidá se 5 ml *kyseliny sírové prosté dusíku R* (95,0% až 95,5% H_2SO_4), uzavře se a silně, jak je možné, se ve směru podélné osy zkumavky po dobu 5 s třepe. Zkumavka se otevře a ihned se umístí do vodní lázně tak, aby se nedotýkala dna nebo stěn lázně, a zahřívá se 10 min. Po 2 min, 4 min, 6 min a 8 min se zkumavka vyjme z vodní lázně a 5 s se silně třepe ve směru podélné osy zkumavky. Na konci desetiminutového zahřívání se zkumavka vyjme z lázně, nechá se stát 10 min a potom se 5 min centrifuguje při 2000 g_n. 4 ml horní vrstvy se převedou do čisté zkumavky. Roztok není intenzivněji zbarven *(2.2.2, Metoda I)* než 4 ml směsi 0,6 ml základního modrého roztoku a 9,4 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l). Spodní vrstva není intenzivněji zbarvena *(2.2.2, Metoda I)* než směs 0,5 ml základního modrého

roztoku, 1,5 ml základního červeného roztoku, 3,0 ml základního žlutého roztoku a 2 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l).

Pevné parafiny. Zahřívá se vhodné množství zkoušené látky při 100 °C po dobu 2 h, ochladí se v exsikátoru nad *kyselinou sírovou R*. Převede se do skleněné zkumavky s vnitřním průměrem asi 25 mm, zkumavka se uzavře a ponoří se do vody s ledem. Po 4 h je tekutina čirá tak, že 0,5 mm silná čára na bílém pozadí umístěná vertikálně za zkumavkou je jasně viditelná.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Paraffinum solidum

Tvrdý parafin

Synonymum. Paraffinum durum

CAS 8002-74-2

Je to směs čištěných tuhých nasycených uhlovodíků, získaná hlavně ze surových parafinových vosků během výroby ropných olejů.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo bílá hmota, prakticky nerozpustná ve vodě. Je snadno rozpustný v etheru a v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Roztavená zkoušená látka v denním světle nejeví fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 15 g se přidá 30 ml vroucí vody a silně se 1 min třepe. Směs se ochladí a vrstvy se oddělí. K 10 ml vodné vrstvy se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. K dalším 10 ml vodné vrstvy se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Použijí se zkoumadla pro spektrofotometrii*. 0,50 g se rozpustí v 25 ml *heptanu R* a směs se převede do 125ml dělicí nálevky s nenamazanými zabroušenými částmi (zátka, uzavírací kohout). Přidá se 5,0 ml *dimethylsulfoxidu R*, silně se 1 min třepe a nechá se stát, dokud se nevytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vrstva se převede do druhé dělicí nálevky, přidají se 2 ml *heptanu R* a směs se silně protřepe. Nechá se stát, dokud se nevytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vrstva se oddělí a měří se absorbance (*2.2.25*) při 265 nm až 420 nm za použití kontrolní tekutiny, kterou je spodní vrstva získaná silným třepáním 5,0 ml *dimethylsufoxidu R* s 25 ml *heptanu R* po dobu 1 min. Připraví se porovnávací roztok *naftalenu R* (7,0 mg/l) v *dimethylsulfoxidu R* a měří se absorbance tohoto roztoku v maximu při 278 nm za použití *dimethylsulfoxidu R* jako kontrolní tekutiny. Absorbance zkoušeného roztoku měřená při 265 nm až 420 nm není při žádné vlnové délce větší než jedna třetina absorbance porovnávacího roztoku při 278 nm.

Snadno zuhelnitelné látky. Do zkumavky se zabroušenou zátkou asi 180 mm dlouhé a o vnějším průměru 20 mm, umyté *kyselinou sírovou R*, vypláchnuté vodou a vysušené se převede 5 ml roztavené zkoušené látky. Přidá se 5 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 10 min ve vodní lázni při 70 °C. Po 5 min, 6 min a 8 min se zkumavka vyjme z vodní lázně nejvýše na 3 s a třikrát se silně zatřepe v podélné ose zkumavky. Během 5 min od konce zahřívání se vrstvy tvrdého parafinu a kyseliny sírové oddělí. Spodní vrstva není intenzivněji zbarvena (*2.2.2, Metoda I*) než směs 0,5 ml základního barevného roztoku modrého, 1,5 ml základního barevného roztoku červeného a 3,0 ml základního barevného roztoku žlutého.

Sírany (*2.4.13*). 2,0 g roztavené zkoušené látky se převedou do 50ml dělicí nálevky se zabroušenou zátkou. Přidá se 30 ml vroucí *vody destilované R*, 1 min se silně třepe a potom se zfiltruje. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na sírany (150 µg/g).

Zbytek po žíhání. 2,00 g se žíhají při 600 °C do konstantní hmotnosti. Zbytek váží nejvýše 1 mg (0,05 %).

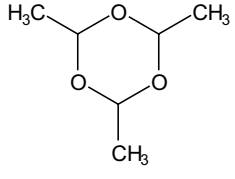
Uchovávání

V dobře uzavřeném obalu, chráněn před světlem.

---

† Paraldehydum

Paraldehyd



$C_6H_{12}O_3$ M_r 132,16 CAS 123-63-7

Je to 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxan, cyklický trimer acetaldehydu. Může obsahovat vhodné množství antioxidantu.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo slabě žlutá průhledná kapalina. Ochlazením tuhne a přechází na krystalickou hmotu. Je dobře rozpustný ve vodě, ale méně rozpustný ve vroucí vodě, mísí se s lihem 96%, s etherem a se silicemi.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je čirý (*2.2.1*), zahřátím se zakalí.

B. K 5 ml se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřeje se; je cítit pach acetaldehydu.

C. K 5 ml roztoku S ve zkumavce se přidá 5 ml *dusičnanu stříbrného amoniakálního RS* a zahřeje se ve vodní lázni. Na stěně zkumavky vznikne stříbrné zrcátko.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 20,0 ml se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 200,0 ml.

Kysele reagující látky. K 50,0 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Index lomu (*2.2.6*). 1,403 až 1,406.

Relativní hustota (*2.2.5*). 0,991 až 0,996.

Destilační rozmezí (*2.2.11*). Nejvýše 10 % předestiluje do 123 °C a nejméně 95 % předestiluje do 126 °C.

Teplota tuhnutí (*2.2.18*). 10 °C až 13 °C.

Acetaldehyd. K 5,0 ml se přidá směs 0,2 ml *oranže methylové RS,* 5 ml *lihu R* 60% (*V/V*) a 5 ml *hydroxylamoniumchloridu v lihu RS* a protřepe se. Ke změně zbarvení indikátoru na čistě žluté se spotřebuje nejvýše 0,8 ml *hydroxidu sodného 0,5 mol/l VS*.

Peroxidy. K 50,0 ml roztoku S se v kulaté baňce se zabroušenou zátkou přidá 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 10 ml *jodidu draselného RS*. Baňka se uzavře a nechá se 15 min stát na místě chráněném před světlem. Potom se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru. Nechá se 5 min stát, a je-li třeba, dotitruje se. Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* je nejvýše 2,0 ml.

Netěkavý zbytek. 5,0 ml se odpaří ve zvážené odpařovací misce na vodní lázni a suší se 1 h při 105 °C. Zbytek váží nejvýše 3 mg (0,6 g/l).

Uchovávání

V malých dobře naplněných vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem na chladném místě. Jestliže látka ztuhne, musí se celý obsah obalu před použitím zkapalnit.

Separandum.

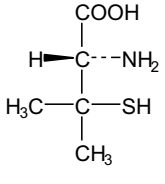
Označování

V označení na obalu se uvede název a množství přidaného antioxidantu.

† Penicillaminum

1998

Penicilamin



$C_5H_{11}NO_2S$ M_r 149,21 CAS 52-67-5

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-merkapto-3-methylmáselná. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_{11}NO_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2.).

A. 0,5 g se rozpustí ve směsi 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 4 ml teplého *acetonu R*, ochladí se ve vodě s ledem a třením tyčinkou o stěny zkumavky se iniciuje krystalizace. Tvoří se bílá sraženina, která se odfiltruje odsátím za pomocí vakua, promyje se *acetonem R* a vysuší se prosáváním vzduchu. Roztok sraženiny (10 g/l) je pravotočivý.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Penicilamindisulfid, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a přibližně i velikostí hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve 4 ml *vody R.*
Porovnávací roztok. 10 mg *penicilaminu CRL* se rozpustí ve 4 ml *vody R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *1-butanolu R* (18 + 18 + 72) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a na 5 min až 10 min se vystaví působení par jodu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 40 mg se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a nechá se 5 min stát; vzniká modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než nejpodobnější porovnávací barevný roztok intenzity 6 (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 5,5; měří se 1 ml roztoku S zředěného *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Specifická optická otáčivost. -61,0° až -65,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředěným stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Penicilamindisulfid. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *penicilaminu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *penicilamindisulfidu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 5 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),

- mobilní fáze, kterou je roztok *kyseliny methansulfonové R* (2 g/l) a *edetanu disodného R* (0,1 g/l), s průtokovou rychlostí 2,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího penicilamindisulfidu větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Látky absorbující v ultrafialovém světle. 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 268 nm není větší než 0,07 (asi 0,5 % kyseliny penilové).

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Rtuť. Nejvýše 10 μg Hg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. K 1,00 g se přidá 10 ml *vody R* a 0,15 ml *kyseliny chloristé R* a krouživým pohybem se zcela rozpustí. Přidá se 1,0 ml roztoku *pyrrolidinyldithiokarbaminanu amonného R* (10 g/l), který byl těsně před použitím třikrát promyt vždy stejným objemem *isobutylmethylketonu R*. Promíchá se a přidají se 2,0 ml *isobutylmethylketonu R* a 1 min se třepe. Pak se směs zředí *vodou R* na 25,0 ml a vrstvy se nechají oddělit. Použije se isobutylmethylketonová vrstva.
Porovnávací roztoky. Rozpustí se množství *oxidu rtuťnatého R* odpovídající 0,108 g HgO v co nejmenším objemu *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml (100 μg Hg/ml). Připraví se porovnávací roztoky stejným způsobem jako zkoušený roztok, avšak namísto zkoušené látky se použijí vhodné objemy roztoku obsahujícího 100 μg Hg/ml.

Změří se absorbance při 254 nm za použití rtuťové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen. Přístroj se nastaví na nulu za použití isobutylmethylketonové vrstvy získané postupem popsaným při přípravě zkoušeného roztoku bez zkoušené látky.

Penicilin. *Všechny postupy se provádějí v atmosféře prosté penicilinu a se zařízením používaným pouze pro tuto zkoušku. Zařízení se sterilizuje 3 h při 180 °C a tlumivé roztoky se sterilizují před použitím 20 min při 121 °C.*

Zkoušený roztok (a). 1,000 g se rozpustí v 8 ml *tlumivého roztoku o pH 2,5*, přidá se 8 ml *etheru R* a 1 min se intenzivně třepe. Extrakce se opakuje a etherové vrstvy se spojí. Pak se přidá 8 ml *tlumivého roztoku o pH 2,5*, 1 min se protřepává, nechá se ustát a kvantitativně se oddělí horní vrstva, přičemž se zcela oddělí vodná fáze (*penicilin je nestálý při pH 2,5; operace se provádějí při tomto pH během 6 min až 7 min*). Přidá se 8 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,0 (2)*, třepe se 5 min, nechá se ustát, oddělí se vodná vrstva a ověří se, že hodnota pH je 6,0.
Zkoušený roztok (b). Ke 2 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 20 μl *penicilinasy RS* a inkubuje se 1 h při 37 °C.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *benzylpenicilinu sodné soli R* se rozpustí v 500 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,0 (2)*. 0,25 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem o pH 2,5* na 200,0 ml a provede se extrakce za použití 8 ml tohoto roztoku, jak je popsáno pro zkoušený roztok (a).
Porovnávací roztok (b). Ke 2 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 20 μl *penicilinasy RS* a inkubuje se 1 h při 37 °C.
Porovnávací roztok (c). Připraví se kontrolní roztok způsobem popsaným pro zkoušený roztok (a) bez zkoušené látky (slepá zkouška).

Připraví se vhodná živná půda, např. taková, jaká je popsána níže, a naočkuje se při vhodné teplotě kulturou mikroba *Micrococcus flavus* (ATCC 9341). Výsledná koncentrace by měla být $5 \cdot 10^4$ mikroorganismů v mililitru nebo jiné množství, je-li to třeba, aby byla získána požadovaná

citlivost a tvorba jasně definovaných inhibičních zón vhodného průměru. Naočkovaná půda se ihned naleje do pěti Petriho misek o průměru 10 cm, aby vznikly vrstvy tloušťky 2 mm až 5 mm. Půda může být též složena ze dvou vrstev, přičemž je naočkovaná pouze horní vrstva. Misky se uchovávají tak, aby před použitím se neprojevil žádný růst nebo úhyn mikroorganismů a aby povrch živné půdy byl v době použití suchý. Do každé misky se dá pět nerezových dutých válečků o průměru 6 mm na povrchu agaru rovnoměrně rozmístěných v kruhu s poloměrem asi 25 mm a soustředně s miskou. Na každou misku se dá do oddělených válečků 0,15 ml zkoušených roztoků (a) a (b) a porovnávacích roztoků (a), (b) a (c). Misky se udržují alespoň 24 h při 30 °C. Pak se změří průměry inhibičních zón s přesností alespoň 0,1 mm. Zkoušku lze hodnotit, jestliže porovnávací roztok (a) vykazuje čistou inhibiční zónu a nedávají-li porovnávací roztoky (b) a (c) žádné inhibiční zóny. Pokud zkoušený roztok (a) vykazuje inhibiční zónu, je způsobena penicilinem tehdy, jestliže zkoušený roztok (b) nevykazuje inhibiční zónu. Je-li tomu tak, průměrná velikost inhibičních zón, která je nalezena u zkoušeného roztoku (a) pro pět Petriho misek, je menší než průměrná velikost inhibičních zón, které vykazuje porovnávací roztok (a) (0,1 μg/g).

Živná půda (pH 6,0)

pepton	5,0 g
kvasnicový výtažek	1,5 g
masový výtažek	1,5 g
chlorid sodný	3,5 g
agar	15,0 g
voda destilovaná R	1000,0 ml

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

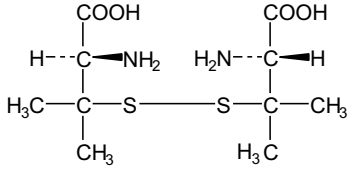
0,1000 g se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,92 mg $C_5H_{11}NO_2S$.

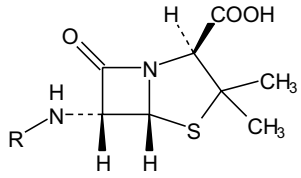
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Nečistoty



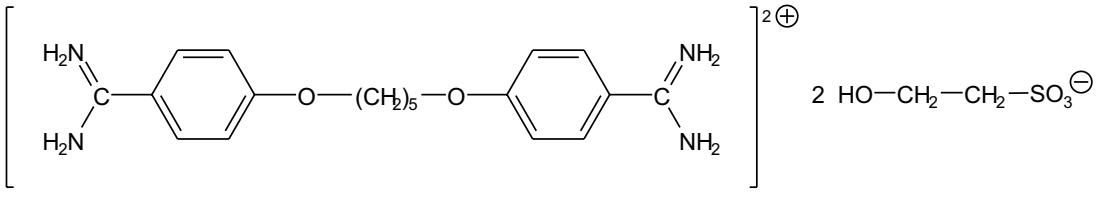
A. kyselina 3,3′-(disulfandiyl)bis[(2*S*)-2-amino-3-methylmáselná] (penicilamindisulfid),



B. penicilin.

† Pentamidini diisetionas

Pentamidiniumdiisetionat



$C_{23}H_{36}N_4O_{10}S_2$ M_r 592,68 CAS 140-64-7

Je to 4,4-(pentamethylendioxy)dibenzamidinium-bis(2-hydroxy-ethansulfonat). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{23}H_{36}N_4O_{10}S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly, hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí na 100,0 ml *lihem 96% R*. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku v rozmezí 230 nm až 340 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 265 nm. Specifická absorbance v maximu je 520 až 560, počítáno na vysušenou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *pentamidiniumdiisetionatu CRL*.

C. 40 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se po kapkách za třepání 1 ml roztoku *chloridu sodného R* (10 g/l) a nechá se stát 5 min; směs zůstane čirá.

D. 0,5 g se rozpustí zahřátím asi na 80 °C v 5 ml *vody R,* přidá se 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, ochladí se v ledové vodě a zfiltruje se. K 2 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné R* a potom 0,2 ml roztoku *hexanitratoceričitanu amonného R* (400 g/l) v *kyselině dusičné zředěné RS;* vzniká oranžovočervené zbarvení. Kontrolní roztok připravený současně stejným způsobem se zbarví žlutě.

E. Asi 30 mg zkoušené látky a 30 mg *ninhydrinu R* se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 1 ml roztoku *tetraboritanu sodného R* (20 g/l) ve *vodě R;* pomalu vzniká objemná bílá sraženina.

F. 0,150 g se zpracuje metodou spalování organických látek (*2.5.10*). K absorpci produktů spalování se použije 10 ml *peroxidu vodíku zředěného RS*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než nejpodobnější porovnávací barevný roztok intenzity 6 (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g zkoušené látky ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). K 0,5 g v kuželové baňce se přidá 50 ml *vody R* a skleněné kuličky a vaří se 30 min. Ochladí se a zředí se *vodou R* na 25 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterou je směs objemových dílů *methanolu R* a roztoku *octanu amonného R* (30 g/l), jehož hodnota pH byla upravena na 7,5 přídavkem *triethylaminu R*, (65 + 35),
- spektrofotometrického detektoru, 265 nm.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaném chromatogramu jsou dva hlavní píky a rozlišení mezi těmito píky je nejméně 2,0. Nastříkne se odděleně 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (a). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,4 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 4,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

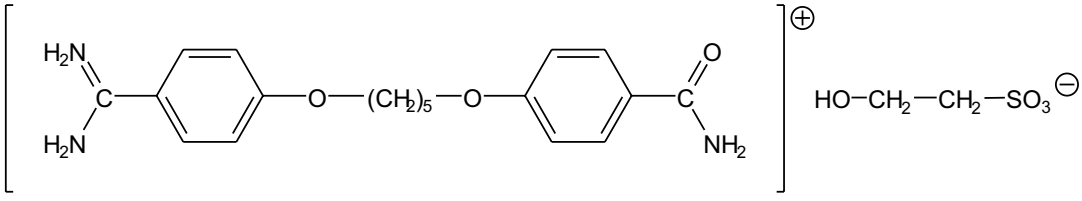
0,250 g se rozpustí v 50 ml *dimethylformamidu R*, přidá se 0,25 ml *modře thymolové RS* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* v atmosféře *dusíku R* do změny zbarvení indikátoru na modré. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,63 mg $C_{23}H_{36}N_4O_{10}S_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

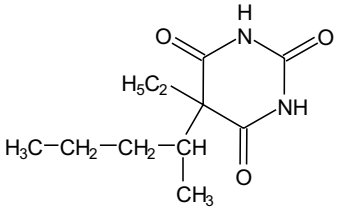
Nečistoty



A. 4-{[5-(4-amidinofenoxy)pentyl]oxy}benzenkarboxamidu-2-hydroxyethansulfonat.

§ Pentobarbitalum

Pentobarbital



$C_{11}H_{18}N_2O_3$ M_r 226,27 CAS 76-74-4

Je to kyselina (*RS*)-5-ethyl-5-(1-methylbutyl)barbiturová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{18}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a v etheru. S alkalickými hydroxidy, uhličitany a s amoniakem tvoří ve vodě rozpustné sloučeniny.

Zkoušky totožnosti

A. Stanoví se teplota tání zkoušené látky *(2.2.14)*. Pak se smíchají stejné díly zkoušené látky a *pentobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Stanovené teploty tání, které jsou asi 133 °C, se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *pentobarbitalu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K asi 10 mg se přidá asi 10 mg *vanilinu R* a 2 ml *kyseliny sírové R.* Směs se 2 min zahřívá na vodní lázni; vzniká červenohnědé zbarvení. Po ochlazení se opatrně přidá 5 ml *ethanolu R;* zbarvení roztoku se změní na fialové a potom na modré.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 6 ml *vody R.* Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 1,0 g se přidá 50 ml *vody R*, směs se 2 min vaří a po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžově žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na čistě žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a potom se postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R.* Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem 96% prostým aldehydů R* (1 : 5), 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a ihned se hodnotí. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku v ultrafialovém světle při 254 nm a po postřiku detekčním činidlem, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Izomer. 0,3 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 5 ml roztoku *uhličitanu sodného bezvodého R* (50 g/l). Přidá se roztok *nitrobenzylchloridu R* (0,3 g) v 10 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem. Ochladí se na 25 °C, je-li třeba, tře se stěna nádoby skleněnou tyčinkou k vyvolání krystalizace. Zfiltruje se, sraženina se promyje pětkrát 5 ml *vody R.* V malé baňce se sraženina rozpustí zahříváním pod zpětným chladičem ve 25 ml *lihu 96% R* na čirý roztok (asi 10 min). Roztok se ochladí na 25 °C, je-li třeba, tře se stěna baňky skleněnou tyčinkou k vyvolání krystalizace. Vyloučená sraženina se zfiltruje, promyje dvakrát 5 ml *vody R* a suší se 30 min při 100 °C až 105 °C. Sraženina taje (*2.2.14*) při 136 °C až 148 °C.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 5 ml *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS.* Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do jasně modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,31 mg $C_{11}H_{18}N_2O_3$.

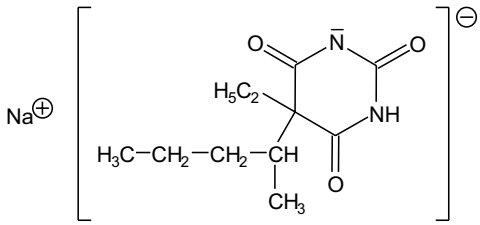
Uchovávání

Psychotropní látka.

§ Pentobarbitalum natricum

Sodná sůl pentobarbitalu

Synonymum. Pentobarbitalum solubile



$C_{11}H_{17}N_2NaO_3$ M_r 248,26 CAS 57-33-0

Je to sodná sůl kyseliny (*RS*)-5-ethyl-5-(1-methylbutyl)barbiturové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_{11}H_{17}N_2NaO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 5 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Vznikne bílá krystalická sraženina, která se odfiltruje, promyje se *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C. Stanoví se teplota tání (*2.2.14*) sraženiny. Smíchají se stejné díly získané sraženiny a *pentobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Stanovené teploty tání, které jsou asi 131 °C, se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok. 25 mg sraženiny získané ve zkoušce totožnosti A se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Porovnávací roztok. 25 mg *pentobarbitalu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K asi 10 mg se přidá asi 10 mg *vanilinu R* a 2 ml *kyseliny sírové R.* Směs se 2 min zahřívá na vodní lázni; vzniká červenohnědé zbarvení. Po ochlazení se opatrně přidá 5 ml *ethanolu R;* zbarvení roztoku se změní na fialové a potom na modré.

D. 1 g se spálí. Zbytek vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 9,6 až 11,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml. Roztok se měří ihned po přípravě.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Potom se vrstva postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R*. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem 96% prostým aldehydů R* (1 : 5), 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a ihned se hodnotí v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Volný pentobarbital. Nejvýše 3,5 %. 2,00 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 75 ml *dimethylformamidu R*. Přidá se 0,25 ml roztoku *modře thymolové R* (10 g/l) v *dimethylformamidu R* a titruje se *methoxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny olivově zeleného zbarvení na modré. Provede se slepá zkouška.

1 ml *methoxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,63 mg pentobarbitalu.

Izomer. 0,3 g se rozpustí v 5 ml roztoku *uhličitanu sodného bezvodého R* (50 g/l). Přidá se roztok *nitrobenzylchloridu R* (0,3 g) v 10 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem. Roztok se ochladí na 25 °C, je-li třeba, tře se stěna nádoby skleněnou tyčinkou k vyvolání krystalizace. Roztok se zfiltruje, sraženina se promyje pětkrát 5 ml *vody R*. V malé baňce se sraženina rozpustí zahříváním pod zpětným chladičem ve 25 ml *lihu 96% R* na čirý roztok (asi 10 min). Roztok se ochladí na 25 °C, je-li třeba, tře se stěna baňky skleněnou tyčinkou k vyvolání krystalizace. Vyloučená sraženina se zfiltruje, promyje dvakrát 5 ml *vody R* a suší se 30 min při 100 °C až 105 °C. Sraženina taje (*2.2.14*) při 136 °C až 148 °C.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml. K 7,5 ml tohoto roztoku se přidá 2,5 ml *kyseliny octové zředěné RS* a 2,5 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a zfiltruje se. Filtrát se zředí *vodou R* na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Při přípravě porovnávacího roztoku se nahradí tlumivý roztok *vodou R*. K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 15 ml roztoku *dusičnanu stříbrného R* (127,5 g/l) v *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do jasně modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

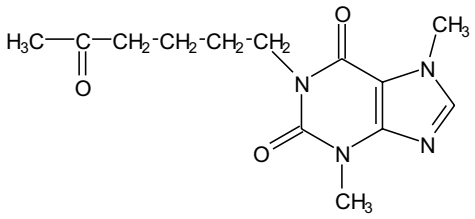
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,83 mg $C_{11}H_{17}N_2NaO_3$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Psychotropní látka.

† Pentoxifyllinum

Pentoxifylin



$C_{13}H_{18}N_4O_3$ M_r 278,31 CAS 6493-05-6

Je to 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{18}N_4O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 103 °C až 107 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *pentoxifylinu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce na xanthiny (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 8 ml roztoku S se přidá 12 ml *vody R* a 0,05 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je zelený nebo žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *pentoxifylinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *pentoxifylinu CRL* a 20 mg *theofylinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *ethylacetatu R* (15 + 85) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy (*2.4.4*). 20 ml roztoku S se protřepe v dělicí nálevce dvakrát s 20 ml *isobutanolu R.* 10 ml vodné vrstvy se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Sírany *(2.4.13).* 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8).* 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 700 Pa.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 20 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,83 mg $C_{13}H_{18}N_4O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. theobromin.

Pepsini pulvis

Pepsin práškový

Synonymum. Pepsinum

CAS 9001-75-6

Je to přípravek ze žaludeční sliznice prasat, hovězího dobytka nebo ovcí. Obsahuje žaludeční proteinasy, které jsou účinné v kyselém prostředí (pH 1 až 5). Počítáno na vysušenou látku, účinnost je nejméně 0,5 Ph.Eur.j. v miligramu. Pepsin se připravuje v podmínkách minimalizujících mikrobiální znečistění.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický nebo amorfní hygroskopický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru. Vodný roztok může slabě opalizovat a mít slabě kyselou reakci.

Zkoušky totožnosti

30 mg *modře fibrinové R* se suspenduje ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS2.* 1 ml této suspenze se umístí na filtrační papír, který se pak promývá *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS2* do získání bezbarvého filtrátu. Ve filtračním papíru se udělá otvor a *modř fibrinová R* se vymývá 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS2* do kuželové baňky. Před použitím se protřepe. Množství zkoušené látky odpovídající nejméně 20 Ph.Eur.j. se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS2* a hodnota pH se upraví na 1,6 ± 0,1. 1 ml tohoto roztoku se přenese do zkumavky obsahující 4 ml suspenze *modře fibrinové R*, promíchá se, umístí se za opatrného protřepávání do vodní lázně při 25 °C. Současně se stejným způsobem provede slepá zkouška za použití 1 ml *vody R*. Po 15min zahřívání je kontrolní roztok získaný při slepé zkoušce bezbarvý a roztok se zkoušenou látkou je modrý.

Zkoušky na čistotu

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší 4 h nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^4 živých mikroorganismů v gramu, stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* (*2.6.13*).

Stanovení účinnosti

Stanoví se porovnáním množství peptidů nevysrážených *kyselinou trichloroctovou RS* a stanovených *zkoumadlem fosfomolybdenan-wolframovým R*, uvolněných za 1 min z roztoku substrátu *hemoglobinu RS* s množstvím peptidů uvolněných *pepsinem práškovým BRP* ze stejného substrátu a za stejných podmínek.

Během přípravy zkoušeného a porovnávacího roztoku je třeba se vyvarovat jejich třepání a zpěnění.

Zkoušený roztok. Těsně před použitím se připraví roztok zkoušené látky v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS2* s předpokládanou účinností 0,5 Ph.Eur.j. v mililitru, je-li třeba, upraví se hodnota pH na 1,6 ± 0,1 *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se na příslušný objem.
Porovnávací roztok. Méně než 15 min před použitím se připraví roztok *pepsinu práškového BRP* obsahující 0,5 Ph.Eur.j. v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS2*, je-li třeba, upraví se hodnota pH na 1,6 ± 0,1 *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* a zředí se na příslušný objem.

Kyselina trichloroctová RS a *hemoglobin RS* se temperují ve vodní lázni při (25 ± 0,1) °C. Do stojanu se připraví tři zkumavky pro porovnávací roztok označené S_1, S_2, S_3 a tři zkumavky pro slepou zkoušku (kontrolní roztoky) označené B_{S1}, B_{S2}, B_{S3}, ve kterých je tyčinka na míchání. Do dalšího stojanu se umístí tři zkumavky pro zkoušený roztok označené T_1, T_2, T_3 a tři zkumavky pro slepou zkoušku (kontrolní roztoky) označené B_{T1}, B_{T2}, B_{T3}. Oba stojany se dají do vodní lázně při (25 ± 0,1) °C.

Do zkumavek S_1, S_2, S_3 a B_{S1}, B_{S2}, B_{S3} se přidá 1,0 ml porovnávacího roztoku a do zkumavek T_1, T_2, T_3 a B_{T1}, B_{T2}, B_{T3} se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku. Nechá se temperovat při (25 ± 0,1) °C.

Do zkumavek B_{S1}, B_{S2}, B_{S3} a B_{T1}, B_{T2}, B_{T3} se přidá 10,0 ml *kyseliny trichloroctové RS*.

V čase 0 se přidá postupně 5,0 ml *hemoglobinu RS* v 30s intervalech do zkumavek S_1, S_2, S_3 a T_1, T_2, T_3. Roztoky se mírně promíchají.

Pak se přidá 5,0 ml *hemoglobinu RS* do zkumavek B_{S1}, B_{S2}, B_{S3} a B_{T1}, B_{T2}, B_{T3} a mírně se promíchá. Přesně 10 min po přidání *hemoglobinu RS* a v intervalech 30 s se reakce zastaví přidáním 10,0 ml *kyseliny trichloroctové RS* do zkumavek S_1, S_2, S_3 a T_1, T_2, T_3 (použije se pevná dělená pipeta nebo automatická pipeta s odvzdušněním) a promíchá se.

Obsah každé zkumavky (zkoušené roztoky, porovnávací roztoky i kontrolní roztoky) se přefiltruje dvakrát přes vhodný filtrační papír, který byl předem promyt roztokem *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l), pak *vodou R* a vysušen. Prvních 5 ml filtrátu se odstraní. 3,0 ml každého filtrátu se převede odděleně do zkumavek s 20 ml *vody R* a promíchá se.

Vhodný filtrační papír vyhovuje následující zkoušce. 5 ml roztoku *kyseliny trichloroctové R* (50 g/l) se zfiltruje přes bílý filtračního papír o průměru 7 cm. Absorbance (*2.2.25*) filtrátu měřená při 275 nm proti nefiltrovanému roztoku *kyseliny trichloroctové R* jako kontrolní kapalině je menší než 0,04.

Do každé zkumavky se přidá 1,0 ml *hydroxidu sodného RS* a 1,0 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R* počínaje kontrolními roztoky a pak zkoušenými a porovnávacími roztoky v každé sadě v uvedeném pořadí.

Nejméně po 15 min se měří absorbance (*2.2.25*) roztoků S_1, S_2, S_3 a T_1, T_2, T_3 při 540 nm proti odpovídajícím kontrolním roztokům. Zkoušku lze hodnotit, jestliže naměřená absorbance je 0,30 až 0,40. Vypočítá se průměrná absorbance pro roztoky S_1, S_2, S_3 a pro roztoky T_1, T_2, T_3.

Uchovávání

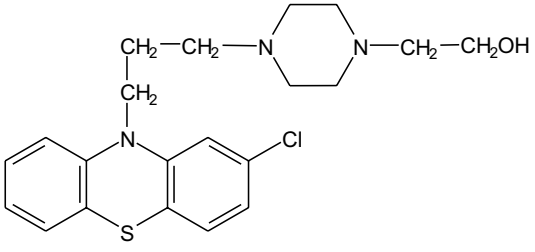
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede účinnost v Ph.Eur.j. v miligramu.

† Perphenazinum

Perfenazin



$C_{21}H_{26}ClN_3OS$ M_r 403,97 CAS 58-39-9

Je to 2-{4-[3-(2-chlor-10-fenothiazinyl)propyl]-1-piperazinyl}ethanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{26}ClN_3OS$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v lihu 96%, mírně rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích kyseliny chlorovodíkové.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 96 °C až 100 °C.

B. 10,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. 10 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 257 nm a 313 nm. Poměr absorbance zjištěné v maximu při 313 nm k absorbanci zjištěné v maximu při 257 nm je 0,120 až 0,128.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *perfenazinu CRL*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *křemeliny G R*. Vrstva se impregnuje v uzavřené chromatografické komoře vyvíjením směsí obsahující 2,5 % (*V/V*) *fenoxyethanolu R* a 7,5 % (*V/V*) *formamidu R* v *acetonu R* tak, aby kraj desky s vrstvou byl ponořen ve vyvíjecí směsi asi 5 mm. Když vyvíjecí směs dosáhla nejméně 17 cm od spodního okraje desky, vyjme se deska z komory a ihned se použije. Vyvíjení chromatogramu se provede ve stejném směru, jako vyvíjení impregnační směsí.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 20 mg *perfenazinu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se za chránění před světlem směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *etheru petrolejového R* nasyceného fenoxyethanolem (2 + 100) po dráze 15 cm (6 objemových dílů *fenoxyethanolu R* se protřepává s 8 objemovými

díly *etheru petrolejového R*, až se směs při třepání trvale zakalí. Potom se nechá ustát a použije se vrchní vrstva, i když je zakalená). Po vyjmutí z komory se vrstva vystaví působení ultrafialového světla při 365 nm a po několika minutách se pozoruje. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, fluorescencí a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Potom se vrstva 20 min zahřívá při 120 °C a po ochlazení se rovnoměrně postříká roztokem *kyseliny sírové R* 10% (*V/V*) v *lihu 96% R*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je stejně zbarvená jako hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,20 g se rozpustí v 10 ml *methanolu R;* roztok je čirý (*2.2.1*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, vody R* a *1-butanolu R* (1 + 14 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogamu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 65 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1500 g se rozpustí ve 25 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,20 mg $C_{22}H_{26}ClN_3OS$.

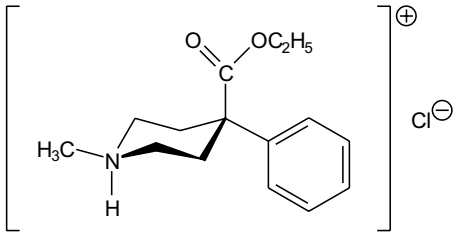
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

§§ Pethidini hydrochloridum

Pethidiniumchlorid

Synonymum. Pethidinium chloratum



$C_{15}H_{22}ClNO_2$ M_r 283,80 CAS 50-13-5

Je to 1-methyl-4-ethoxykarbonyl-4-fenylpiperidiniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{22}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 187 °C až 190 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. pethidiniumchloridu.*

C. 0,1 g se rozpustí v 10 ml *ethanolu R* a přidá se 10 ml *trinitrofenolu RS;* tvoří se krystalická sraženina, která po promytí *vodou R* a vysušení při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 186 °C až 193 °C. Smíchá se stejné množství sraženiny a zkoušené látky a stanoví se teplota tání směsi, která je alespoň o 20 °C nižší než teplota tání sraženiny.

D. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 5 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,2 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Po přidání 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* se roztok zbarví červeně.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *křemeliny G R*. Vrstva se impregnuje v uzavřené chromatografické komoře vyvíjením směsí objemových dílů

fenoxyethanolu R a *acetonu R* (10 + 90) (deska je ponořena asi 5 mm ve směsi) po dráze nejméně 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu vzduchu a okamžitě se použije. Vyvíjení se provede stejným směrem jako impregnace.

Zkoušený roztok. 0,1 g látky se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 2 ml *etheru R* a protřepe se. Po oddělení vrstev se použije horní vrstva jako zkoušený roztok.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *etherem R* na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *fenoxyethanolu R* a *petroletheru R* (1 + 8 + 100) po dráze 12 cm. Vrstva se 10 min suší na vzduchu a vyvíjení se opakuje. Vrstva se 10 min suší na vzduchu a postříká se roztokem *dichlorfluoresceinu R* (2 g/l) v *methanolu R*. Po 5 min se vrstva postříká *vodou R*, až je pozadí vrstvy bílé až slabě žluté. Při pozorování na denním světle jsou na chromatogramech patrné červené nebo oranžové skvrny. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %); pak se chromatogramy ihned pozorují v ultrafialovém světle při 365 nm; jsou patrny skvrny fluoreskující intenzivně žlutě. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 30 ml *bezvodé kyseliny octové R*, přidá se 5 ml *octanu rtuťnatého RS*, 0,1 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* z fialově modrého do zeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,38 mg $C_{15}H_{22}ClNO_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Omamná látka.

Petroselini radix

N

Petrželový kořen

Synonymum. Radix petroselini

Je to usušený kořen druhu *Petroselinum crispum* (MILL.) A.W.HILL. Obsahuje nejméně 1 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga aromatického pachu, nasládlé, slabě kořenité chuti.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kořen vřetenovitý, jen zřídka větvený, často podélně rozpůlený. Na svrchní straně nažloutle bílý, příčně kroužkovaný až hluboce brázditý, svraskalý. Lom nerovný, bělavý. Na příčném řezu patrná nažloutle bílá, úzká kůra a široké, na obvodu citronově žluté dřevo.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je nažloutlý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky parenchymu s malými škrobovými zrny o průměru až 1 μm; drobné siličné kanálky nebo jejich úlomky; skupiny sítkovic, úlomky korku.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 3 g čerstvě upráškované drogy (355) se protřepávají 10 min s 10 ml *chloroformu R* a pak se zfiltruje. Filtrát se odpaří opatrně na vodní lázni na asi 2 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *eugenolu R* se rozpustí v 10 ml *chloroformu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně 50 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se *toluenem R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *vanilinu R* v *kyselině sírové R* (10 g/kg) a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou dvě hlavní skvrny v oblasti vymezené skvrnou eugenolu na chromatogramu porovnávacího roztoku a čelem chromatogramu. Skvrna s vyšší hodnotou R_F, odpovídající myristicinu, je méně intenzivní než skvrna apiolu. Na chromatogramu mohou být další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 % a nejvýše 5 % ztmavlé drogy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Stanovení obsahu

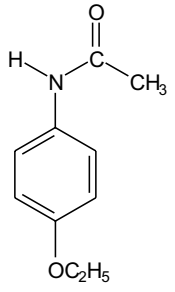
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 50,0 g čerstvě práškované drogy (355) se destiluje 3 h rychlostí 3 ml/min až 3,5 ml/min v 2000ml baňce se 600 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Phenacetinum

Fenacetin



$C_{10}H_{13}NO_2$ M_r 179,22 CAS 62-44-2

Je to 4′-ethoxyacetanilid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{13}NO_2$.

Vlastnosti

Jemný bílý krystalický prášek nebo bílé lesklé šupinkovité krystalky. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 134 °C až 137 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenacetinu CRL*.

C. K asi 50 mg se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 1 ml *vody R* a 30 s se vaří. Rychle se ochladí, zfiltruje, sraženina se promyje *vodou R* a rekrystaluje z *lihu 96% R*. Vzniklé žluté krystaly tají (*2.2.14*) při 100 °C až 103 °C.

D. K 0,1 g se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 1 min se vaří. Přidá se 10 ml *vody R*, ochladí se a zfiltruje. K filtrátu se přidá 0,1 ml *dichromanu draselného RS;* vznikne fialové zbarvení, které se rychle změní na rubínově červené.

Zkoušky na čistotu

Chloracetanilid. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. K 2,5 g se přidá 15 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (400 g/l) a zahřívá se pod zpětným chladičem až do úplného rozpuštění (30 min). Ochladí se na asi 40 °C a chladičem se přidá 15 ml *methanolu R*. Ochladí se asi na 20 °C, odstraní se chladič a za chlazení se přidá 15 ml *amoniaku zředěného RS1*. Zředí se *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok. 38 mg *chloranilinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se *dichlormethanem R* po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu a vloží se na 15 min do komory s oxidy dusíku vznikajícími v kuželové baňce umístěné v komoře po přidání 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* (500 g/l) k 10 ml roztoku obsahujícího *dusitan sodný R* (100 g/l) a *jodid draselný R* (30 g/l). Po odstranění oxidů dusíku z povrchu vrstvy proudem horkého vzduchu se vrstva postříká roztokem *naftylethylendiamoniumdihydrochloridu R* (5 g/l) v *lihu 96% R*. Vrstva se vysuší a znovu se postříká. Jestliže se na chromatogramu porovnávacího roztoku neobjeví skvrna, postříká se vrstva znovu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající chloracetanilidu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (100 μg/g).

***p*-Fenetidin.** 0,3 g se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R*, přidají se 3 ml *vody R* a 0,05 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a zahřeje se k varu; nevzniká červené zbarvení.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 1 h v sušárně při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,350 g se přidá 17,5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 12,5 ml *vody R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 40 ml *vody R*. Roztok se přemístí do lázně s ledovou vodou, přidá se 1 ml roztoku *ferocyfenu R* (10 g/l) v *kyselině sírové R* a titruje se zvolna *dusitanem sodným 0,1 mol/l VS* v atmosféře dusíku za magnetického míchání do změny žlutého zbarvení do čistě fialového.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,92 mg $C_{10}H_{13}NO_2$.

Uchovávání

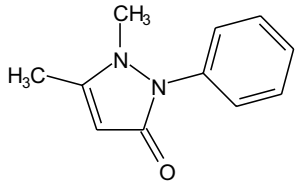
Separandum.

---

† Phenazonum

Fenazon

Synonymum. Antipyrinum



$C_{11}H_{12}N_2O$ M_r 188,23 CAS 60-80-0

Je to 1-fenyl-2,3-dimethyl-3-pyrazolin-5-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{11}H_{12}N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu, mírně rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 109 °C až 113 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenazonu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R.*

C. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 4 ml *vody R*, 0,25 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 1 ml *dusitanu sodného RS;* vzniká zelené zbarvení.

D. K 1 ml roztoku S se přidají 4 ml *vody R* a 0,5 ml *chloridu železitého RS2;* vzniká červené zbarvení, které zmizí po přidání *kyseliny sírové zředěné RS.*

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je červený. Přidá se 0,25 ml *červeně methylové RS* a 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený nebo žlutočervený.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 µg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 6 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, přidají se 2 g *octanu sodného R*, 25,0 ml *jodu 0,05 mol/l VS* a nechá se stát 30 min v temnu. Přidá se 25 ml *dichlormethanu R*, třepe se do rozpuštění sraženiny a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru, který se přidá ke konci titrace. Provede se slepá zkouška.

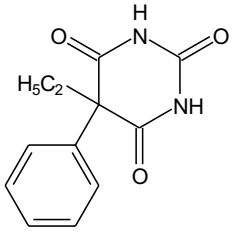
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 9,41 mg $C_{11}H_{12}N_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

§ Phenobarbitalum

Fenobarbital



$C_{12}H_{12}N_2O_3$ M_r 232,24 CAS 50-06-6

Je to kyselina 5-ethyl-5-fenylbarbiturová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a dobře rozpustný v etheru. S alkalickými hydroxidy, uhličitany a s amoniakem tvoří ve vodě rozpustné sloučeniny.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Stanoví se teplota tání *(2.2.14)*. Smíchají se stejné díly zkoušené látky a *fenobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Stanovené teploty tání, které jsou asi 176 °C, se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenobarbitalu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *fenobarbitalu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 6 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 1,0 g se přidá 50 ml *vody R*, směs se 2 min vaří a po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžově žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na čistě žluté se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a potom se postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R.* Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem 96% prostým aldehydů R* (1 : 5), 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a ihned se hodnotí. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku v ultrafialovém světle při 254 nm a po postřiku detekčním činidlem, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 5 ml *pyridinu R*, přidá se 0,5 ml *thymolftaleinu RS* a 10 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*. Titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* do jasně modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,61 mg $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

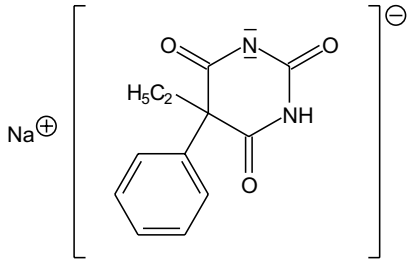
Uchovávání

Psychotropní látka.

§ Phenobarbitalum natricum

Sodná sůl fenobarbitalu

Synonymum. Phenobarbitalum solubile



$C_{12}H_{11}N_2NaO_3$ M_r 254,22 CAS 57-30-7

Je to sodná sůl kyseliny 5-ethyl-5-fenylbarbiturové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{11}N_2NaO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě prosté oxidu uhličitého (malá část může být nerozpuštěná), dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v dichlormethanu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a protřepe se s 20 ml *etheru R.* Etherová vrstva se oddělí, promyje se 10 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha, zbytek se vysuší při 100 °C až 105 °C a stanoví se teplota tání (*2.2.14*) takto získaného zbytku ze zkoušené látky. Smíchají se stejné díly zbytku zkoušené látky a *fenobarbitalu CRL* a stanoví se teplota tání této směsi. Stanovené teploty tání, které jsou asi 176 °C, se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zbytku zkoušené látky získaného ve zkoušce totožnosti A se shoduje se spektrem *fenobarbitalu CRL*. Jestliže se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se zbytek zkoušené látky a referenční látka odděleně v *ethanolu R,* odpaří se do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu R* 50% (*V/V*) a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 90 mg *fenobarbitalu CRL* se rozpustí v *lihu R* 50% (*V/V*) a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm.

Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku *(2.3.1)*.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí v *lihu R* 50% (*V/V*) a zředí se jím na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. Nejvýše 10,2; měří se následující roztok: 5,0 g se dle možností úplně rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *lihu R* 50% (*V/V*) a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem R* 50% (*V/V*) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a potom se postříká *zkoumadlem difenylkarbazon-rtuťnatým R*. Po vysušení na vzduchu se vrstva postříká čerstvě připraveným *hydroxidem draselným v lihu RS* zředěným *lihem 96% prostým aldehydů R* (1 : 5), 5 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C a ihned se hodnotí. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku v ultrafialovém světle při 254 nm a po postřiku detekčním činidlem, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrně na startu.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 7,0 %; 0,500 g se suší 4 h v sušárně při 150 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 8 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS,* zahřeje se k varu a ochladí se. Přidá se 30 ml *methanolu R* a třepe se do úplného rozpuštění. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Po získání prvního inflexního bodu se titrace přeruší, přidá se 10 ml *pyridinu R*, promíchá se a pokračuje se v titraci. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,42 mg $C_{12}H_{11}N_2NaO_3$.

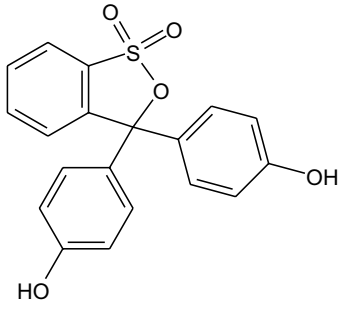
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Psychotropní látka.

† Phenolsulfonphthaleinum

Fenolsulfonftalein

Synonymum. Červeň fenolová



$C_{19}H_{14}O_5S$ M_r 354,38 CAS 143-74-8

Je to 4,4′-(3*H*-2,1-benzoxathiol-3-yliden)difenol-S,S-dioxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{19}H_{14}O_5S$.

Vlastnosti

Světle až tmavě červený krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 10 mg se rozpustí v roztoku *uhličitanu sodného R* (10 g/l) a zředí se jím na 200,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *uhličitanu sodného R* (10 g/l) na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 400 nm až 630 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 558 nm. Specifická absorbance v maximu je 1900 až 2100.

B. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a přidá se 9 ml *vody R;* roztok je tmavě červený. K 5 ml roztoku se přidá mírný nadbytek *kyseliny sírové zředěné RS;* roztok se zbarví oranžově.

C. K 5 ml roztoku ze zkoušky B se přidá 1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l s bromidem draselným RS* a 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, protřepe se a nechá se 15 min stát. Zalkalizuje se roztokem *hydroxidu sodného zředěného RS;* vznikne intenzivně fialově modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 5 ml.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *terc.amylalkoholu R* (25 + 25 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel, vystaví se působení par *amoniaku 26% R* a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je, kromě hlavní skvrny, pouze jedna skvrna, která není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Nerozpustný zbytek. 1,0 g se jemně rozetře, přidá se 12 ml *hydrogenuhličitanu sodného RS* a nechá se 1 h stát za občasného protřepání. Potom se zředí *vodou R* na 100 ml a 15 h se nechá stát. Odstřeďuje se 30 min při 2000 g_n až 3000 g_n, supernatantní tekutina se dekantuje a zbytek se promyje nejprve 25 ml roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* (10 g/l) a potom 25 ml *vody R*. Vysuší se při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 5 mg (0,5 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g upráškované zkoušené látky se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,900 g se rozpustí v 15 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml *kyseliny octové ledové R*, 20,0 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS,* 5 ml roztoku *bromidu draselného R* (100 g/l) a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R.* Ponechá se stát 15 min v uzavřené baňce se zabroušenou zátkou chráněn před světlem. Poté se přidá 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l) a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* odpovídá 4,43 mg $C_{19}H_{14}O_5S$.

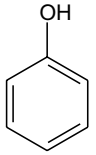
Uchovávání

Separandum.

---

† Phenolum

Fenol



C_6H_6O M_r 94,11 CAS 108-95-2

Je to benzenol. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny C_6H_6O.

Vlastnosti

Bezbarvé nebo slabě růžové nebo nažloutlé krystaly nebo krystalická hmota, rozplývající se. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96%, v glycerolu a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí ve 2 ml *amoniaku 26% R*. Látka se zcela rozpustí. Roztok se zředí *vodou R* na 100 ml. Ke 2 ml tohoto roztoku se přidá 0,05 ml *chlornanu sodného RS;* vzniká modré zbarvení, které se pozvolna prohlubuje.

B. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 10 ml *vody R* a 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne fialové zbarvení, které zmizí po přidání 5 ml *2-propanolu R*.

C. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 10 ml *vody R* a 1 ml *bromové vody RS;* vznikne bledě žlutá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6 (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *methyloranže RS;* roztok je žlutý.

Teplota tuhnutí (*2.2.18*). Nejméně 39,5 °C.

Zbytek po odpaření. Nejvýše 0,05 %; 5,000 g se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se suší 1 h při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se převede do baňky se zabroušenou zátkou a přidá se 50,0 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l s bromidem draselným VS* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Baňka se uzavře a nechá se stát 30 min za občasného promíchání a pak ještě dalších 15 min. Přidá se 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l), protřepe se a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* do slabě žlutého zbarvení. Přidá se 0,5 ml *škrobu RS* a 10 ml *chloroformu R* a pokračuje se v titraci za intenzivního protřepávání. Provede se slepá zkouška.

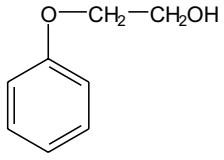
1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l s bromidem draselným VS* odpovídá 1,569 mg C_6H_6O.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Phenoxyethanolum

Fenoxyethanol



$C_8H_{10}O_2$ M_r 138,17 CAS 122-99-6

Je to 2-fenoxyethanol. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_8H_{10}O_2$.

Vlastnosti

Bezbarvá slabě viskózní kapalina. Je těžce rozpustný ve vodě, mísitelný s acetonem, s lihem 96% a s glycerolem, těžce rozpustný v podzemnicovém oleji a v olivovém oleji.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Index lomu (*2.2.6*). 1,537 až 1,539.

B. 80,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 240 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 269 nm a 275 nm. Specifická absorbance v maximu při 269 nm je 95 až 105 a v maximu při 275 nm je 75 až 85.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenoxyethanolu CRL*.

D. 2 ml se třepou 30 min se směsí 4 g *manganistanu draselného R*, 5,4 g *uhličitanu sodného R* a 75 ml *vody R*. Přidá se 25 g *chloridu sodného R* a nepřetržitě se 60 min míchá. Zfiltruje se a okyselí *kyselinou chlorovodíkovou R* na hodnotu pH asi 1,7. Teplota tání (*2.2.14*) sraženiny po rekrystalizaci z *vody R* je 96 °C až 99 °C.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota (*2.2.5*). 1,105 až 1,110.

Příbuzné látky. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *methyllauratu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,25 g *methyllauratu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 25 ml.
Zkoušený roztok (a). 5,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 g se rozpustí v *dichlormethanu R*, přidá se 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlormethanem R* na 10,0 ml.

Porovnávací roztok. K 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlormethanem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (150 μm až 180 μm), impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 130 °C a teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 200 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku a citlivost detektoru se nastaví tak, aby výšky dvou píků, kromě píku rozpouštědla, nebyly menší než 70 % celé stupnice zapisovače. Látky se eluují v pořadí: fenoxyethanol a methyllaurat. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku není rozlišení mezi píky fenoxyethanolu a methyllauratu menší než 12.

Nastříkne se 1 μl zkoušeného roztoku (a). Na získaném chromatogramu se ověří, že není přítomen žádný pík o stejném retenčním čase, jako má vnitřní standard.

Nastříkne se odděleně po 1 μl zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku. Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající pětinásobku retenčního času fenoxyethanolu (asi 5 min). Z chromatogramu porovnávacího roztoku se vypočítá poměr (*R*) plochy píku fenoxyethanolu k ploše píku vnitřního standardu. Z chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se vypočítá poměr součtu ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku vnitřního standardu a píku rozpouštědla, k ploše píku vnitřního standardu; tento poměr není větší než *R* (1,0 %).

Fenol. 1,00 g se rozpustí v 50 ml *dichlormethanu R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R* a protřepe se. Horní vrstva se promyje dvakrát 20 ml *dichlormethanu R* a zředí *vodou R* na 100,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 287 nm není větší než 0,27 (0,1 %).

Stanovení obsahu

Ke 2,000 g v acetylační baňce opatřené vzdušným chladičem se přidá 10,0 ml čerstvě připraveného *acetanhydridu RS1* a zahřívá se 45 min ve vodní lázni za častého protřepání. Ochladí se, opatrně se přidá 10 ml *vody R* a zahřívá se další 2 min. Znovu se ochladí, přidá se 10 ml *1-butanolu R*, intenzivně se třepe a titruje se nadbytek kyseliny octové *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za použití 0,2 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru. Celý postup se opakuje bez zkoušené látky. Rozdíl spotřeb odměrného roztoku při obou titracích odpovídá množství acetanhydridu potřebného k acetylaci zkoušené látky.

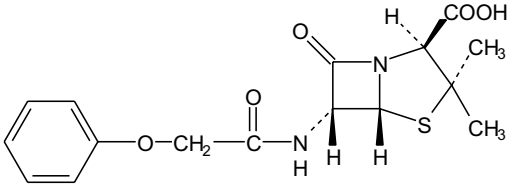
1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 0,1382 g $C_8H_{10}O_2$.

Uchovávání

V nádobách dobře uzavřených.

† Phenoxymethylpenicillinum

Fenoxymethylpenicilin



$C_{16}H_{18}N_2O_5S$ M_r 350,39 CAS 87-08-1

Je to kyselina (6*R*)-6-(2-fenoxyacetamido)penicilanová produkovaná určitými kmeny *Penicillium notatum* nebo příbuznými organismy na živné půdě s obsahem vhodného prekurzoru nebo získaná jiným způsobem. Vztaženo na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % penicilinů, počítáno jako $C_{16}H_{18}N_2O_5S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Hodnota pH, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenoxymethylpenicilinu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *acetonu R.*
Porovnávací roztok (a). 25 mg *fenoxymethylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *acetonu R.*
Porovnávací roztok (b). 25 mg *draselné soli benzylpenicilinu CRL* a 25 mg *draselné soli fenoxymethylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou ledovou R* na hodnotu 5,0, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vybarvení skvrn a hodnotí se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 2 mg se převedou do zkumavky délky asi 150 mm a průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS.* Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je červenohnědý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě červenohnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,4 až 4,0; měří se následující suspenze: 50 mg se suspenduje v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +186° až +200°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *1-butanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 0,100 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml; absorbance tohoto roztoku měřená při 306 nm není větší než 0,36. 20,0 ml roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml; absorbance tohoto roztoku měřená v maximu při 274 nm je nejméně 0,56.

Kyselina fenoxyoctová. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyseliny fenoxyoctové R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, kyseliny mravenčí bezvodé R* a *diisopropyletheru R* (1 + 7 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (1,5 g/l) v roztoku *kyseliny sírové R* 5% (*V/V*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající kyselině fenoxyoctové intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Rozkladné produkty. K 0,2500 g se přidá 25 ml *vody R* a 25 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6*, třepe se do úplného rozpuštění a ihned se titruje *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití merkurosulfatové elektrody jako srovnávací a platinové nebo rtuťové elektrody jako indikační.

Obsah rozkladných produktů (*D*), vyjádřený jako $C_{16}H_{18}N_2O_5S$, se v procentech vypočte ze vzorce:

$$\frac{0{,}7008 \ . \ n}{m} \ ,$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech.

Peniciliny. 50,0 mg se rozpustí v 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, přidá se 5 ml *vody R* a nechá se 15 min stát. Poté se přidá 5,0 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l VS*, 20 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a 20 ml *vody R*. Titruje se při 35 °C až 40 °C *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití merkurosulfatové elektrody jako srovnávací a platinové nebo rtuťové elektrody jako indikační. Titruje se tak pomalu, aby titrace trvala asi 15 min. Předběžné inflexe na titrační křivce se neberou v úvahu.

Obsah penicilinů, vyjádřený jako $C_{16}H_{18}N_2O_5S$, se v procentech vypočte ze vzorce:

$$\frac{0{,}7008 \ . \ n_1}{m_1} - D \ ,$$

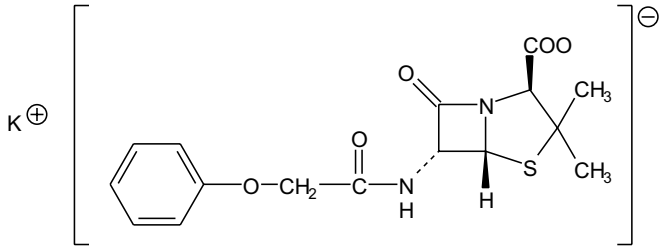
v němž značí:
m_1 - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
D - obsah rozkladných produktů v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Phenoxymethylpenicillinum kalicum

Draselná sůl fenoxymethylpenicilinu



$C_{16}H_{17}KN_2O_5S$ M_r 388,48 CAS 132-98-9

Je to draselná sůl kyseliny (6*R*)-6-(2-fenoxyacetamido)penicilanové produkovaná určitými kmeny *Penicillium notatum* nebo příbuznými organismy na živné půdě s obsahem vhodného prekurzoru nebo získaná jiným způsobem. Vztaženo na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % penicilinů, počítáno jako $C_{16}H_{17}KN_2O_5S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, prakticky nerozpustná v etheru, v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *draselné soli fenoxymethylpenicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *draselné soli fenoxymethylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *draselné soli benzylpenicilinu CRL* a 25 mg *draselné soli fenoxymethylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou ledovou R* na hodnotu 5,0, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vybarvení skvrn a hodnotí se na denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky délky asi 150 mm a průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá kroužením; roztok je červenohnědý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vznikne tmavě červenohnědé zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na draslík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,5 až 7,5; měří se následující roztok: 50 mg se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +215° až +230°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance *(2.2.25)*. 0,100 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml; absorbance tohoto roztoku měřená při 306 nm není větší než 0,33. 20,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml; absorbance tohoto roztoku měřená v maximu při 274 nm je nejméně 0,50.

Kyselina fenoxyoctová. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyseliny fenoxyoctové R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, kyseliny mravenčí bezvodé R* a *diisopropyletheru R* (1 + 7 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (1,5 g/l) v roztoku *kyseliny sírové R* 5% (*V/V*). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající kyselině fenoxyoctové intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Rozkladné produkty. K 0,2500 g se přidá 25 ml *vody R* a 25 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6*, třepe se do úplného rozpuštění a ihned se titruje *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití merkurosulfatové elektrody jako srovnávací a platinové nebo rtuťové elektrody jako indikační.

Obsah rozkladných produktů (*D*), vyjádřený jako $C_{16}H_{17}KN_2O_5S$, se v procentech vypočte ze vzorce:

$$\frac{0{,}777 \ . \ n}{m} \ ,$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v gramech,
n - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech.

Peniciliny. 50,0 mg se rozpustí v 5,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, přidá se 5 ml *vody R* a nechá se 15 min stát. Poté se přidá 5,0 ml *kyseliny dusičné 1 mol/l RS*, 20 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6* a 20 ml *vody R*. Titruje se při 35 °C až 40 °C *dusičnanem rtuťnatým 0,02 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* za použití merkurosulfatové elektrody jako srovnávací a platinové nebo rtuťové elektrody jako indikační. Titruje se tak pomalu, aby titrace trvala asi 15 min. Předběžné inflexe na titrační křivce se neberou v úvahu.

Obsah penicilinů, vyjádřený jako $C_{16}H_{17}KN_2O_5S$, se v procentech vypočte ze vzorce:

$$\frac{0{,}777 \ . \ n_1}{m_1} - D \ ,$$

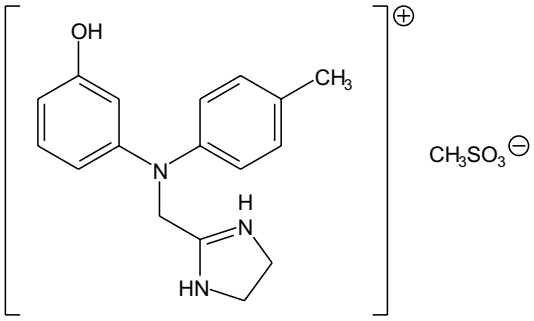
v němž značí:
m_1 - navážku zkoušené látky v gramech,
n_1 - spotřebu *dusičnanu rtuťnatého 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
D - obsah rozkladných produktů v procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Phentolamini mesilas

Fentolaminiummesilat



$C_{18}H_{23}N_3O_4S$ M_r 377,46 CAS 65-28-1

Je to 2-[N-(3-hydroxyfenyl)-N-(4-tolyl)aminomethyl]-4,5-dihydro-1*H*-imidazoliummethansulfonat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{18}H_{23}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, slabě hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 178 °C až 182 °C.

B. 60,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 278 nm. Specifická absorbance v maximu je 220 až 245.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem fentolaminiummesilatu Ph. Eur.*

D. 0,5 g se rozpustí ve směsi 5 ml *lihu 96% R* a 5 ml roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (10 g/l) a přidá se 0,5 ml roztoku *vanadičnanu amonného R* (5 g/l); vznikne světle zelená sraženina.

E. 50 mg se smíchá s 0,2 g *hydroxidu sodného R*, zahřívá se do roztavení a pokračuje se v zahřívání několik sekund. Nechá se vychladnout a přidá se 0,5 ml teplé *vody R*. Okyselí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a zahřeje se. Uvolňuje se oxid siřičitý, který zbarví navlhčený *papír škrobový s jodičnanem draselným R* modře.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 0,1 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, zředí se jí na 10 ml a přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS*. Pokud je roztok červený, ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.
Porovnávací rotok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R* a *2-butanonu R* (5 + 15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intezivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*) Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

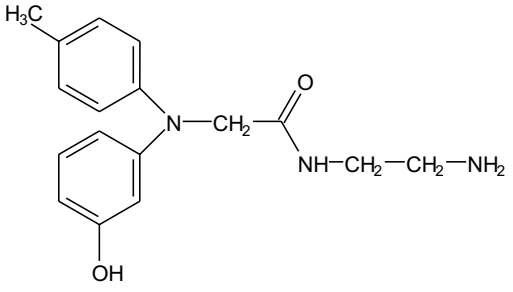
0,300 g se rozpustí ve 100 ml *2-propanolu R1* a titruje se v atmosféře dusíku *tetrabutylamoniumhydroxidem v propanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) a použití skleněné elektrody jako indikační a kalomelové elektrody obsahující nasycený roztok *tetramethylamoniumchloridu R* v *2-propanolu R1* jako srovnávací elektrody. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu v propanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,75 mg $C_{18}H_{23}N_3O_4S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

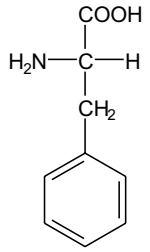


A. N-(2-aminoethyl)-2-[(3-hydroxyfenyl)(4-methylfenyl)amino]acetamid.

Phenylalaninum

Fenylalanin

Synonyma. L-Phenylalaninum, L-fenylalanin



$C_9H_{11}NO_2$ M_r 165,19 CAS 63-91-2

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-fenylpropanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{11}NO_2$.

Vlastnosti

Lesklé bílé vločky nebo bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *fenylalaninu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 10 mg se přidá 0,5 g *dusičnanu draselného R* a 2 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 20 min ve vodní lázni. Po ochlazení se přidá 5 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (50 g/l) a nechá se 10 min stát ve vodě s ledem. Pak se přidá 9,0 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS;* vzniká fialově červené až fialově hnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -33,0° až -35,5°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *fenylalaninu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *fenylalaninu CRL* a 10 mg *tyrosinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy (*2.4.4*). 0,25 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy bez dalšího přidání kyseliny dusičné (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody destilované R* (5 + 25) a zředí se stejnou směsí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. Připraví se dvě hodinová sklíčka o průměru 60 mm umístěná těsně vedle sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s papírem lakmusovým se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,52 mg $C_9H_{11}NO_2$.

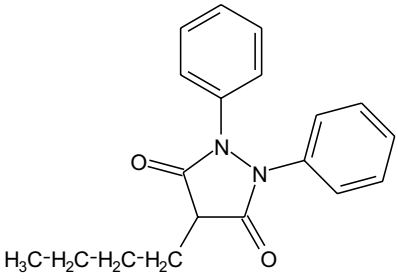
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

† Phenylbutazonum

Fenylbutazon



$C_{19}H_{20}N_2O_2$ M_r 308,38 CAS 50-33-9

Je to 4-butyl-1,2-difenyl-3,5-pyrazolidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{20}N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v etheru, mírně rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se v alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 104 °C až 107 °C.

B. 30,0 mg se rozpustí v 25 ml *methanolu R*, přidá se 50 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 240 nm až 350 nm vykazuje absorpční maximum při 264 nm. Specifická absorbance v maximu je 650 až 700. Jako kontrolní roztok se použije směs 0,5 ml *methanolu R*, 1,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 98,5 ml *vody R*.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenylbutazonu CRL*.

D. K 0,1 g se přidá 1 ml *kyseliny octové ledové R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a směs se 30 min zahřívá pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidají 3 ml roztoku *dusitanu sodného R* (7 g/l); vznikne žluté zbarvení. K 1 ml tohoto roztoku se přidá roztok 10 mg *2-naftolu R* v 5 ml *uhličitanu sodného RS;* vznikne červenohnědá až červenofialová sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí za protřepávání ve 20 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a roztok se nechá stát 3 h při 25 °C.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g se smíchá s 50 ml *vody R* a zahřeje se k varu. Ochladí se třepáním v uzavřené baňce a zfiltruje se. K 25 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*. Přidá se 0,6 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 0,1 ml *červeně methylové RS;* roztok je červený nebo oranžový.

Absorbance (*2.2.25*). Absorbance roztoku S měřená v 40mm vrstvě při 420 nm není větší než 0,20.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*. Vrstva se rovnoměrně postříká roztokem *disiřičitanu sodného R* (20 g/l), až je úplně mokrá, suší se 15 min na vzduchu a 30 min se zahřívá při 120 °C. Před použitím se ochladí.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* obsahujícího 0,2 g/l *butylhydroxytoluenu R* a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 5 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* obsahujícího 0,2 g/l *butylhydroxytoluenu R* na 200 ml. Připraví se bezprostředně před použitím.

Na vrstvu se ihned odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *cyklohexanu R, chloroformu R* (10 + 40 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se 10 min suší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,2 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 80 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 25 ml *acetonu R,* přidá se 0,5 ml *modři bromthymolové RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do modrého zbarvení stálého nejméně 15 s. Provede se slepá zkouška.

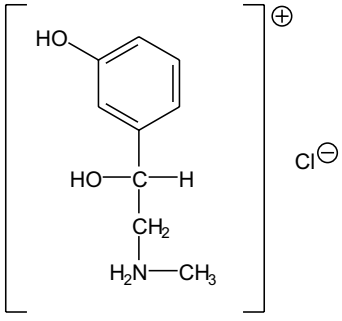
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,84 mg $C_{19}H_{20}N_2O_2$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Phenylephrini hydrochloridum

Fenylefriniumchlorid



$C_9H_{14}ClNO_2$ M_r 203,67 CAS 61-76-7

Je to (*R*)-N-methyl-2-(3-hydroxyfenyl)-2-hydroxyethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{14}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.
Taje při asi 143 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *fenylefriniumchloridu CRL.*

C. 0,3 g se rozpustí ve 3 ml *vody R*, přidá se 1 ml *amoniaku zředěného RS1* a vyvolá se krystalizace třením skleněnou tyčinkou o stěnu zkumavky. Vzniklé krystaly se promyjí ledovou *vodou R* a suší se 2 h při 105 °C. Krystaly tají (*2.2.14)* při 171 °C až 176 °C.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *vody R,* přidá se 0,05 ml roztoku *síranu měďnatého R* (125 g/l) a 1 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l); vzniká fialové zbarvení. Přidá se 1 ml *etheru R* a protřepe se; etherová vrstva zůstává bezbarvá.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,00 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -43° až -47°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 200 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 5 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R, amoniaku 26% R* a *2-propanolu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Potom se vrstva usuší v proudu studeného vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS*, zahřívá se 5 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Ketony. 10,0 ml roztoku S se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 310 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* jako kontrolního roztoku není větší než 0,20.

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 µg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1500 g se rozpustí ve směsi 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 80 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným v ethanolu 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

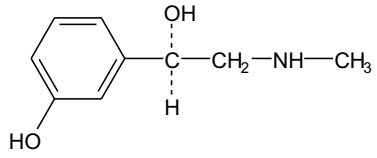
1 ml *hydroxidu sodného v ethanolu 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,37 mg $C_9H_{14}ClNO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Phenylephrinum

Fenylefrin



$C_9H_{13}NO_2$ M_r 167,21 CAS 59-42-7

Je to (*R*)-1-(3-hydroxyfenyl)-2-(methylamino)ethanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_9H_{13}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, mírně rozpustný v methanolu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 174 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenylefrinu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS,* přidá se 0,05 ml *síranu měďnatého RS* a 1 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (200 g/l); vzniká fialové zbarvení. Přidá se 1 ml *etheru R* a protřepe se; etherová vrstva zůstává bezbarvá.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -53° až -57°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,250 g v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Absorbance. 0,50 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se stejným rozpouštědlem na 200 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 315 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* jako kontrolního roztoku je nejvýše 0,15 (0,4 %), počítáno jako 1-(3-hydroxyfenyl)-2-(methylamino)-1-ethanon.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.25*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R.*

Směs rozpouštědel. Připraví se směs stejných objemových dílů *dichlormethanu R* a methanolického roztoku kyseliny chlorovodíkové (1 objemový díl *kyseliny chlorovodíkové R* se zředí na 10 objemových dílů *methanolem R*).
Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *fenylefrinu CRL* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 1 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí rozpouštědel na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí rozpouštědel na 50 ml.

Na vrstvu se nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 25 + 70) po dráze 15 cm. Potom se vrstva usuší v proudu studeného vzduchu, pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm a potom se rovnoměrně postříká roztokem *červeně pravé B R* (1 g/l) v roztoku *uhličitanu sodného R* (50 g/l) a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Asi 0,150 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 1 mol/l VS* odpovídá 16,72 mg $C_9H_{13}NO_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 1-(3-hydroxyfenyl)-2-(benzylamino)-1-ethanon,
B. (*S*)-1-(3-hydroxyfenyl)-2-)methylamino)-1-ethanol,
C. 1-(3-hydroxyfenyl)-2-(methylamino)-1-ethanon.

† Phenylhydrargyri boras

Fenylhydrargyriumborat

Synonyma. Phenylhydrargyrum boricum, Hydrargyrum phenylboricum, boritan fenylrtuťnatý

CAS 8017-88-7

Je to sloučenina ekvimolárních podílů fenylhydrargyriumdihydrogenboratu ($C_6H_7BHgO_3$; M_r 338,52) a fenylhydrargyriumhydroxidu (C_6H_6HgO; M_r 294,70) nebo její dehydratovaná forma (metaboritan, $C_{12}H_{11}BHg_2O_3$; M_r 615,21) nebo směs obou látek. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 64,5 % až 66,0 % Hg (A_r 200,59) a 9,8 % až 10,3 % boritanu (počítáno jako H_3BO_3; M_r 61,83).

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek nebo bezbarvé, lesklé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Ke 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 8 ml *vody R* a 0,1 ml *sulfidu sodného RS;* vzniká bílá sraženina, která zahříváním pomalu tmavne.

B. K 0,1 g se ve zkumavce přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a zahřívá se, až se vzniklý roztok zbarví tmavě hnědě. Roztok se převede 20 ml *vody R* do kádinky na 50 ml. Je cítit pach nitrobenzenu.

C. Asi 20 mg se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.* Roztok je čirý a bezbarvý, po zapálení hoří plamenem na okraji zeleným.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí nasypáním na povrch 25 ml vroucí vody, ochladí se a zředí se *vodou R* na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Ionizovaná rtuť. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *jodidu draselného RS* a 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát je bezbarvý. Sraženina se promyje 3 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá k filtrátu. Ke spojeným filtrátům se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se na 20 ml *vodou R.* 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy *(2.4.8)*. Porovnávací roztok je směs 2,5 ml základního *roztoku olova (2 µg Pb/ml)* a 7,5 ml *vody R.*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,5 %; suší se 0,500 g 15 h ± 30 min v sušárně při 45 °C.

Stanovení obsahu

Rtuť. 0,300 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidají se 3 ml *kyseliny dusičné R* a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru do trvalého červenožlutého zbarvení.

1 ml *thiokyanatanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,06 mg Hg.

Boritany. 0,600 g se zahřátím rozpustí ve 25 ml *vody R*. V horkém roztoku se rozpustí 10 g *sorbitolu R*, ochladí se, přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do trvalého růžového zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 6,18 mg H_3BO_3.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Phenylhydrargyri nitras

Dusičnan fenylrtuťnatý

CAS 8003-05-2

Je to směs dusičnanu fenylrtuťnatého ($C_6H_5HgNO_3$; M_r 339,70) a hydroxidu fenylrtuťnatého (C_6H_5HgOH; M_r 294,70). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 62,5 % až 64,0 % Hg (A_r 200,59).

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný v horké vodě. Rozpouští se v glycerolu a v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

A. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 8 ml *vody R* a 0,1 ml *sulfidu sodného RS;* vzniká bílá sraženina, která zahříváním pomalu tmavne.

B. K 1 ml nasyceného roztoku zkoušené látky se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS;* vzniká bílá vločkovitá sraženina.

C. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, 2 ml *dichlormethanu R* a 0,2 ml *dithizonu RS* a protřepe se; spodní vrstva je oranžově žlutá.

D. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 0,1 g se přidá 45 ml *vody R* a zahřívá se za protřepávání k varu. Ochladí se a zfiltruje. Filtrát se zředí *vodou R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Anorganické rtuťnaté sloučeniny. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *jodidu draselného RS*, 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se; filtrát je bezbarvý. Sraženina na filtru se promyje 2 ml *vody R*. Spojí se filtrát a promývací voda, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (0,1 %) *(2.4.8)*. K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 24 h ve vakuu.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 90 ml *vody R* a zahřívá se k varu. Ochladí se na 15 °C až 20 °C a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru do červenožlutého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *thiokyanatanu amonného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,06 mg Hg.

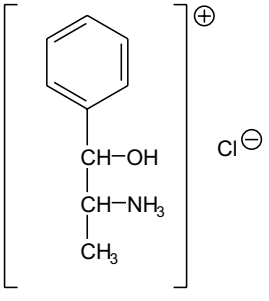
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Phenylpropanolamini hydrochloridum

Fenylpropanolamoniumchlorid

Synonymum. Norephedrini hydrochloridum



$C_9H_{14}ClNO$ M_r 187,67 CAS 154-41-6

Je to (1*RS*,2*SR*)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_9H_{14}ClNO$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 194 °C až 197 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *fenylpropanolamoniumchloridu CRL*. Měří se tablety látek bez rekrystalizace.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *síranu měďnatého RS* a 0,3 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* vznikne fialové zbarvení. Přidají se 2 ml *etheru R* a protřepe se; mezi dvěma vrstvami vznikne fialová sraženina.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *fenylpropanolamoniumchloridu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *norpseudoefedriniumchloridu R* se rozpustí v *lihu 96% R*, přidá se 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 60 mg *chloridu amonného R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Před nanášením roztoků se vrstva postříká roztokem *tetraboritanu sodného R* (20 g/l) za použití 8 ml na desku 100 mm x 200 mm a suší se 30 min v proudu studeného vzduchu.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku do proužků 10 mm x 3 mm a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, lihu 96% R* a *1-butanolu R* (6 + 24 + 70) po dráze 10 cm. Vrstva se suší v proudu teplého vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel a po ochlazení se postříká roztokem *ninhydrinu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá se 15 min při 110 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající chloridu amonnému, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Fenylpropanonamin. 1,0 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 283 nm není větší než 0,10.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1500 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

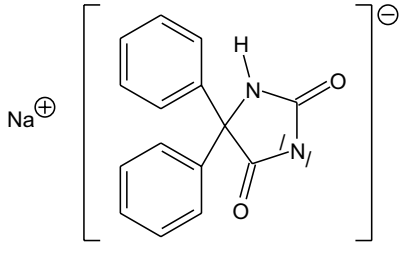
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,77 mg $C_9H_{14}ClNO$.

Uchovávání

Separandum.

† Phenytoinum natricum

Sodná sůl fenytoinu



$C_{15}H_{11}N_2NaO_2$ M_r 274,25 CAS 630-93-3

Je to natrium-5,5-difenyl-2,4-dioxo-3-imidazolidinid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{15}H_{11}N_2NaO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek, slabě hygroskopický. Je dobře rozpustná ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,1 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*, okyselí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* a vytřepává se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové výtřepky se promyjí *vodou R*, odpaří se do sucha a zbytek se vysuší při 100 °C až 105 °C (zbytek zkoušené látky). Postup se opakuje za použití 0,1 g *sodné soli fenytoinu CRL* (zbytek referenční látky). Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zbytku zkoušené látky se shoduje se spektrem zbytku referenční látky. Měří se tablety s *bromidem draselným R*.

B. K asi 10 mg se přidá 1 ml *vody R* a 0,05 ml *amoniaku 17,5% RS* a zahřívá se, až začne směs vřít. Pak se přidá 0,05 ml roztoku *síranu měďnatého R* (50 g/l) v *amoniaku zředěném RS2* a protřepe se; vznikne růžová krystalická sraženina.

C. 1 g se vyžíhá a zbytek se ochladí. Přidají se 2 ml *vody R* a roztok se neutralizuje *kyselinou chlorovodíkovou R*. Zfiltruje se a filtrát se zředí *vodou R* na 4 ml. 0,1 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled vzorku. 1,0 g se suspenduje v 5 ml *vody R* a zředí se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *benzofenonu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vrstva se suší 2 min v proudu studeného vzduchu. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *chloroformu R* a *2-propanolu R* (10 + 45 + 45) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 5 min v sušárně při 80 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není skvrna odpovídající benzofenonu intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající benzofenonu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %).

Volný fenytoin. 0,30 g se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *pyridinu R* a *vody R*. Přidá se 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a 3 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,180 g se suspenduje ve 2 ml *vody R*, přidá se 8,0 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l VS* a 1 min se mírně zahřívá. Přidá se 30 ml *methanolu R*, ochladí se a titruje *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Po dosažení prvního inflexního bodu se přeruší přidávání *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*, přidá se 5 ml *dusičnanu stříbrného v pyridinu RS*, promíchá se a pokračuje se v titraci. Odečte se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* mezi dvěma inflexními body.

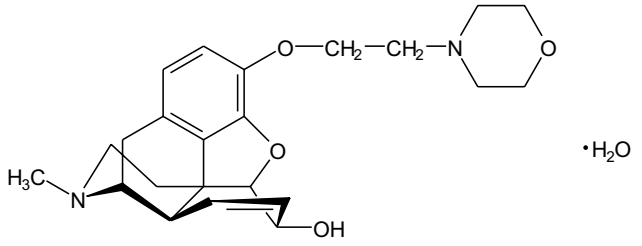
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,43 mg $C_{15}H_{11}N_2NaO_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

§§ Pholcodinum

Folkodin



$C_{23}H_{30}N_2O_4 . H_2O$ M_r 416,52

M_r bezvodého 398,50 CAS 509-67-1

Je to monohydrát (5*R*,6*S*)-4,5-epoxy-N-methyl-3-(2-morfolinoethoxy)-7-morfinen-6-olu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{23}H_{30}N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. folkodinu*.

B. 0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 75 ml *vody R* a 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm. Roztok vykazuje absorpční maximum při 284 nm. Specifická absorbance v maximu je 36 až 38.

C. 50 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny sírové R* a přidá se 0,05 ml *molybdenanu amonného RS;* vznikne světle modré zbarvení, které se změní mírným zahřátím v tmavě modré. Přidá se 0,05 ml *kyseliny dusičné zředěné RS;* zbarvení se změní v hnědočervené.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -94° až -98°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,000 g v *lihu 96% R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *chloroformem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, acetonu R, lihu 96% R* a *toluenu R* (2,5 + 32,5 + 35 + 35) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným zředěným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %) a pouze jedna taková skvrna nad hlavní skvrnou je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Morfin. 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 5 ml. Přidají se 2 ml roztoku *dusitanu sodného R* (10 g/l), nechá se stát 15 min a přidají se 3 ml *amoniaku zředěného RS1*. Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_4 (*2.2.2, Metoda II*) (asi 0,13 % morfinu).

Ztráta sušením (*2.2.32*). 3,9 % až 4,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,180 g se rozpustí mírným zahřátím v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence do druhé inflexe.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 19,93 mg $C_{23}H_{30}N_2O_4$.

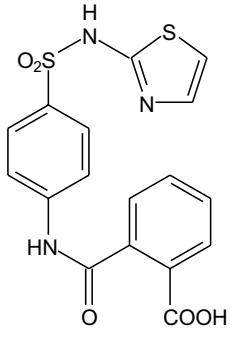
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Omamná látka.

† Phthalylsulfathiazolum

Ftalylsulfathiazol



$C_{17}H_{13}N_3O_5S_2$ M_r 403,43 CAS 85-73-4

Je to kyselina N-[4-(2-thiazolylsulfamoyl)fenyl]amidoftalová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{17}H_{13}N_3O_5S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru, snadno rozpustný v dimethylformamidu, těžce rozpustný v acetonu a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *ftalylsulfathiazolu CRL*.

B. K 1 g se přidá 8,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Ochladí se, přidá se 17,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, silně se protřepe a zfiltruje se. Filtrát se neutralizuje *hydroxidem sodným zředěným RS*, znovu se zfiltruje, sraženina se promyje *vodou R*, rekrystalizuje z *vody R* a krystaly se vysuší při 100 °C až 105 °C. Krystaly tají (*2.2.14*) při 200 °C až 203 °C.

C. K 0,1 g ve zkumavce se přidají 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,5 g *zinku práškového R*. Vyvíjejí se dýmy, které způsobí zčernání *papíru s octanem olovnatým R*.

D. K 0,1 g se přidá 0,5 g *resorcinolu R* a 0,3 ml *kyseliny sírové R*, zahřeje se na vodní lázni do vzniku homogenní směsi, ochladí se a přidá se 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. 0,1 ml této nahnědle červené směsi se zředí *vodou R* na 25 ml; vznikne intenzivní zelená fluorescence, která zmizí po okyselení.

E. Asi 10 mg krystalů ze zkoušky B se rozpustí v 200 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*. 2 ml tohoto roztoku vyhovují zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*) vznikem oranžové sraženiny.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok HŽ $_5$(*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. Ke 2,0 g se přidá 20 ml *vody R*, 30 min se nepřetržitě třepe a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Sulfathiazol a jiné primární aromatické aminy. 5 mg se rozpustí ve směsi 3,5 ml *vody R*, 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 25 ml *lihu 96% R* předem ochlazené na 15 °C. Ihned se umístí do ledové vody, přidá se 1 ml roztoku *dusitanu sodného R* (2,5 g/l) a nechá se 3 min stát. Potom se přidá 2,5 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (40 g/l), nechá se 5 min stát, přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (4 g/l) a zředí se *vodou R* na 50 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 550 nm není větší než absorbance současně stejným způsobem připraveného porovnávacího roztoku, kterým je směs 1 ml roztoku obsahujícího ve 100 ml 10 mg *sulfathiazolu R*, 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 2,5 ml *vody R*, 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 25 ml *lihu 96% R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 40 ml *dimethylformamidu R*, přidá se 0,2 ml *thymolftaleinu RS* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do vzniku modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,17 mg $C_{17}H_{13}N_3O_5S_2$.

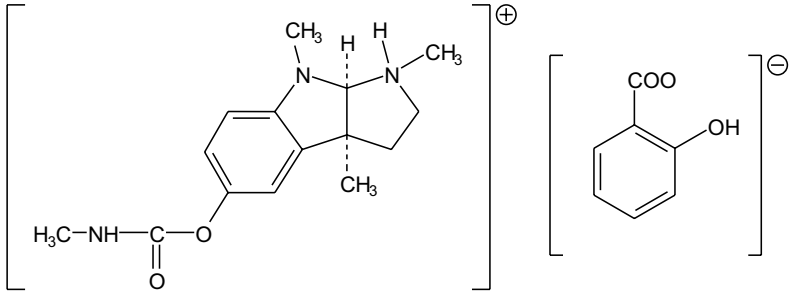
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

†† Physostigmini salicylas

Fysostigminiumsalicylat

Synonyma. Physostigminium salicylicum, Eserinum salicylicum, Eserini salicylas



$C_{22}H_{27}N_3O_5$ M_r 413,47 CAS 57-64-7

Je to (3a*S*,8a*R*)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-5-methylkarbamoyloxy-1,3a,8-trimethylpyrrolo[2,3-*b*]-indoliumsalicylat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{27}N_3O_5$.

Vlastnosti

Bezbarvé nebo téměř bezbarvé krystalky. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru. Krystalky postupně červenají, jsou-li vystaveny vlivu vzduchu a světla; zbarvení se vyvíjí rychleji, jsou-li krystalky vystaveny též vlhkosti. Vodné roztoky jsou nestálé.

Taje při asi 182 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *fysostigminiumsalicylatu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 10 mg se zahřívá v porcelánové misce s několika kapkami *amoniaku zředěného RS1;* vzniká oranžové zbarvení. Roztok se odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v *lihu 96% R;* vznikne modrý roztok, který se po přidání 0,1 ml *kyseliny octové ledové R* barví fialově. Po zředění tohoto roztoku *vodou R* se objeví intenzivně červená fluorescence.

D. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na salicylany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,900 g se rozpustí bez zahřívání v 95 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,1 až 5,9; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -90° až -94°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *fysostigminiumsalicylatu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *2-propanolu R* a *cyklohexanu R* (2 + 23 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a vyvíjí se ještě jednou stejným směrem. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a postříká se čerstvě připraveným *jodobismutitanem draselným RS* a potom *peroxidem vodíku zředěným RS*. Vrstva se pak pozoruje do 2 min. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Eseridin. K 5 ml roztoku S se přidá několik krystalů *jodičnanu draselného R*, 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se. Do 1 min nevznikne ve vrstvě chloroformu fialové zbarvení.

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,1 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným při zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 50 ml směsi stejných dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *chloroformu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,35 mg $C_{22}H_{27}N_3O_5$.

Uchovávání

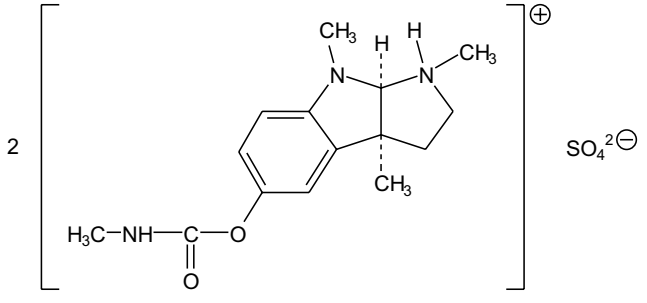
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

†† Physostigmini sulfas

Fysostigminiumsulfat

Synonymum. Eserini sulfas



$C_{30}H_{44}N_6O_8S$ M_r 648,77 CAS 64-47-1

Je to bis{(3a*S*,8a*R*)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-5-methylkarbamoyloxy-1,3a,8-trimethylpyrrolo-[2,3-*b*]indolium}sulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{30}H_{44}N_6O_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, hygroskopický. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Na vzduchu a světle se postupně barví červeně; zbarvení se vyvíjí rychleji, když je látka vystavena též vlhkosti. Vodné roztoky jsou nestálé.

Taje při asi 145 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.

Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *fysostigminiumsulfatu CRL*. Měří se tablety s *bromidem draselným R*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 10 mg se zahřívá v porcelánové misce s 0,5 ml *amoniaku zředěného RS1;* vzniká oranžové zbarvení. Roztok se pak odpaří do sucha a zbytek se rozpustí v *lihu 96% R;* vznikne modrý roztok, který se po přidání 0,1 ml *kyseliny octové ledové R* barví fialově a po zředění *vodou R* se objeví intenzivní červená fluorescence..

D. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí bez zahřívání ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 5,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -116° až -120°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,15 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *fysostigminiumsulfatu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *2-propanolu R* a *cyklohexanu R* (2 + 23 + 100) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a vyvíjí se ještě jednou stejným směrem. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a postříká se čerstvě připraveným *jodobismutitanem draselným RS* a potom *peroxidem vodíku zředěným RS*. Vrstva se pak pozoruje do 2 min. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Eseridin. K 5 ml roztoku S se přidá několik krystalků *jodičnanu draselného R*, 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se. Po 1 min není chloroformová vrstva zbarvena intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 5 ml *vody R* místo roztoku S.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným při zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

0,5000 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 40 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) do prvního inflexního bodu.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 64,88 mg $C_{30}H_{44}N_6O_8S$.

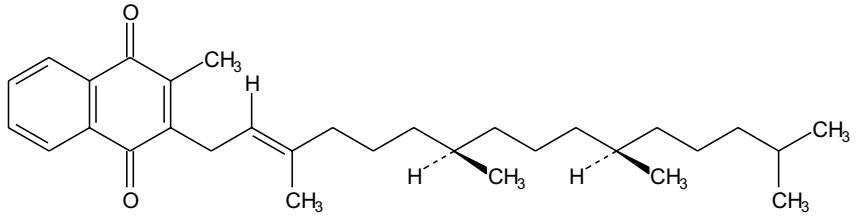
Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem.
Venenum.

† Phytomenadionum

Fytomenadion

Synonymum. Vitamin K_1



$C_{31}H_{46}O_2$ M_r 450,70 CAS 84-80-0

Je to směs 2-methyl-3-[(2*E*)-(7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecenyl]-1,4-naftochinonu (*trans*-fytomenadion), 2-methyl-3-[(2*Z*)-(7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecenyl]-1,4-naftochinonu (*cis*-fytomenadion) a 2-methyl-2,3-dihydro-2,3-epoxy-3-[(2*E*)-(7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecenyl]-1,4-naftochinonu (*trans*-epoxyfytomenadion).

Obsahuje nejvýše 4,0 % *trans*-epoxyfytomenadionu a nejméně 75,0 % *trans*-fytomenadionu. Celkový obsah tří složek je 97,0 % až 103,0 %.

Vlastnosti

Čirá jasně žlutá viskózní olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, mísitelný s etherem a s mastnými oleji. Působením světla se rozkládá.

Index lomu je asi 1,526.

Zkoušky totožnosti

Zkoušky se provádějí co nejrychleji a za chránění před přímým světlem.

A. 10,0 mg se rozpustí v *trimethylpentanu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) při 275 nm až 340 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 327 nm a absorpční minimum při 285 nm. Specifická absorbance v maximu je 67 až 73.

10,0 ml tohoto roztoku se zředí *trimethylpentanem R* na 50,0 ml a měří se absorbance při 230 nm až 280 nm; roztok vykazuje čtyři absorpční maxima, při 243 nm, 249 nm, 261 nm a 270 nm.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Menadion a další příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 50 mg se rozpustí v 10 ml *methanolu R* a přidá se 1 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (200 g/l) v *methanolu R;* vzniká zelené zbarvení, které zahříváním ve vodní lázni při 40 °C přechází na fialově červené a pak stáním na červenohnědé.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,5 g se rozpustí v *trimethylpentanu R* a zředí se jím na 25 ml; roztok je čirý (*2.2.1*).

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 2; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Menadion a další příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,40 g se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *cyklohexanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *fytomenadionu CRL* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *cyklohexanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 4,0 mg *menadionu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *cyklohexanu R* a *toluenu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se 5 min suší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Pak se postříká roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l) v *ethanolu R*, 5 min se zahřívá při 120 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající menadionu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající menadionu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrnám pod hlavní skvrnou, které od ní nemusí být zcela odděleny.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 15,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15,0 mg *fytomenadionu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 15,0 mg *fytomenadionu CRL* a 4,0 mg *trans-epoxyfytomenadionu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 µm) o porozitě 8 nm,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *diisopropyletheru R*, *oktanolu R* a *heptanu R* (3,3 + 0,67 + 1000). Průtoková rychlost je 0,4 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b), a pokud je použit zapisovač, nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou relativní retenční časy vzhledem k *trans*-fytomenadionu následující: *trans*-epoxyfytomenadion asi 0,6 a *cis*-fytomenadion asi 0,7.

Postupně se šestkrát nastříkne po 20 l porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku *trans*-izomeru je menší než 1 % a rozlišení mezi píky *trans*-fytomenadionu a *cis*-fytomenadionu je nejméně 2,5. Pak se nastříkne 20 l zkoušeného roztoku a 20 l porovnávacího roztoku (a) a vypočítá se obsah *trans*-fytomenadionu, *cis*-fytomenadionu a *trans*-epoxyfytomenadionu v procentech z následujících výrazů:

$$mtrans\text{-}fytomenadion = \frac{m' \cdot A'_{trans} \cdot S_{trans}}{m \cdot S'_{trans}},$$

$$cis\text{-}fytomenadion = \frac{m' \cdot A'_{cis} \cdot S_{cis}}{m \cdot S'_{cis}},$$

$$2trans\text{-}epoxyfytomenadion = \frac{m' \cdot A'_{epoxy} \cdot S_{epoxy}}{m \cdot S'_{epoxy}},$$

v nichž značí:

m' - hmotnost referenční látky v porovnávacím roztoku (a) v miligramech,
m - hmotnost zkoušené látky ve zkoušeném roztoku v miligramech,
A'_{trans} - obsah *trans*-fytomenadionu ve *fytomenadionu CRL* v procentech,
A'_{cis} - obsah *cis*-fytomenadionu ve *fytomenadionu CRL* v procentech,
A'_{epoxy} - obsah *trans*-epoxyfytomenadionu ve *fytomenadionu CRL* v procentech,
S_{trans} - plochu píku *trans*-izomeru na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S_{cis} - plochu píku *cis*-izomeru na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S_{epoxy} - plochu píku *trans*-epoxyfytomenadionu na chromatogramu zkoušeného roztoku,
S'_{trans} - plochu píku *trans*-izomeru na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
S'_{cis} - plochu píku *cis*-izomeru na chromatogramu porovnávacího roztoku (a),
S'_{epoxy} - plochu píku *trans*-epoxyfytomenadionu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

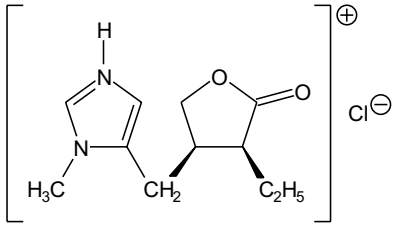
Nečistoty

A. 2-methyl-1,4-naftochinon (menadion).

† Pilocarpini hydrochloridum

Pilokarpiniumchlorid

Synonymum. Pilocarpinium chloratum



$C_{11}H_{17}ClN_2O_2$ M_r 244,72 CAS 54-71-7

Je to (3*S*,4*R*)-(3-ethyl-4,5-dihydro-2-oxo-3*H*-furan-4-yl)methyl-1-methyl-imidazoliumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{17}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je hygroskopický, velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 203 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *pilokarpiniumchloridu CRL*. Jsou-li látky zkoušeny ve formě tablet, připraví se za použití *chloridu draselného R*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 2 ml, přidá se 0,05 ml roztoku *dichromanu draselného R* (50 g/l), 1 ml *peroxidu vodíku zředěného RS* a 2 ml *chloroformu R* a protřepe se; chloroformová vrstva se zbarví fialově.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 4,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +89° až +93°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *pilokarpiniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 2 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 14 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C a po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným zředěným RS* a potom *peroxidem vodíku zředěným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku železa (1 μg Fe/ml)* a 5 ml *vody R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí v 60 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

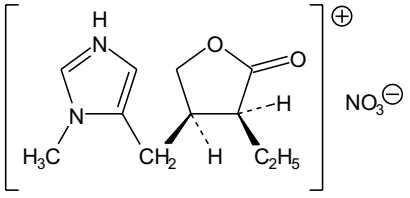
1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 0,2447 g $C_{11}H_{17}ClN_2O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Pilocarpini nitras

Pilokarpiniumnitrat



$C_{11}H_{17}N_3O_5$ M_r 271,27 CAS 148-72-1

Je to (3*S*,4*R*)-(3-ethyl-4,5-dihydro-2-oxo-3*H*-furan-4-yl)methyl-1-methyl-imidazoliumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{17}N_3O_5$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky, citlivé na světlo. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 174 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *pilokarpiniumnitratu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí na 2 ml *vodou R*, přidá se 0,05 ml roztoku *dichromanu draselného R* (50 g/l), 1 ml *peroxidu vodíku zředěného RS*, 2 ml *chloroformu R* a protřepe se; chloroformová vrstva se zbarví fialově.

E. Vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml. Připraví se těsně před použitím.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 4,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +80,0° až +83,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,3 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 15 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *pilokarpiniumnitratu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 3 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *methanolu R* a *amoniaku 26% R* (85 + 14 + 1) po dráze 15 cm. Vrstva se 10 min suší při 100 °C až 105 °C a po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Chloridy *(2.4.4)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (70 µg/g).

Železo *(2.4.9)*. 10 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku železa (1 µg Fe/ml)* a 5 ml *vody R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 0,100 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,5 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,13 mg $C_{11}H_{17}N_3O_5$.

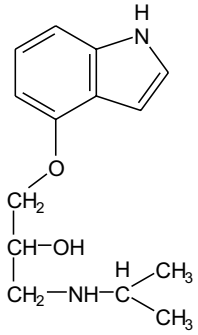
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Pindololum

Pindolol



$C_{14}H_{20}N_2O_2$ M_r 248,32 CAS 13523-86-9

Je to (*RS*)-1-(4-indolyloxy)-3-isopropylamino-2-propanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{20}N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.

Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 169 °C až 174 °C.

B. 20,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,085 % *(V/V)* v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí na 100,0 ml roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* 0,085 % (*V/V*) v *methanolu R*. Měří se absorbance tohoto roztoku při 230 nm až 320 nm (*2.2.25*). Roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 264 nm a 287 nm, a prodlevu při 275 nm. Specifická absorbance v maximu při 264 nm je 330 až 350 a v maximu při 287 je 170 až 190.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *pindololu CRL*.

D. Chromatogramy na vrstvě A získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok HŽ $_5$nebo H $_5$(*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.
Všechny postupy je třeba provádět co nejrychleji a za chránění před světlem.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se stejnou směsí na 5 ml. Připraví se těsně před použitím a nanese se na vrstvu jako poslední.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *methanolu R* (1 + 99) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *pindololu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *methanolu R* (1 + 99) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *methanolu R* (1 + 99) na 50 ml.

A. Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a ihned se vyvíjí čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethylacetatu R* a *methanolu R* (4 + 50 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se krátce suší v proudu studeného vzduchu, ihned se postříká *dimethylaminobenzaldehydem RS7* a zahřívá se 20 min při 50 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %).

B. Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a ihned se vyvíjí čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *etylacetatu R* a *methanolu R* (4 + 50 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se krátce usuší v proudu studeného vzduchu a ihned se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny a skvrn detegovaných na vrstvě A, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 80 ml *methanolu R* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,83 mg $C_{14}H_{20}N_2O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 1-[7-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropyl)indol-4-yloxy]-3-isopropylamino-2-propanol,
B. 1-[1-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropyl)indol-4-yloxy]-3-isopropylamino-2-propanol,
C. 3,3-bis(indol-4-yloxy)-N-isopropyl-1,1-imino-bis(2-propanol)-hydrogenmalonat,
D. 4-(2,3-dihydroxypropoxy)indol,
E. 4-hydroxyindol,
F. 4-(2-hydroxy-3-chlorpropoxy)indol.

Pini pumilionis etheroleum

N

Kosodřevinová silice

Synonyma. Pini pumilionis aetheroleum, Oleum pini pumilionis

Je to silice získaná z čerstvého jehličí a mladších větévek druhu *Pinus mughus* SCOP. destilací s vodní parou.

Obsahuje 3,0 % až 10,0 % esterů, počítáno jako bornylacetat ($C_{12}H_{20}O_2$; M_r 196,29).

Vlastnosti

Bezbarvá až slabě zelenožlutá čirá kapalina. Je charakteristického pachu, aromatické, později palčivé a hořké chuti, velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, etherem a mastnými oleji. Působením světla a vzduchu houstne a barví se temněji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 μl *bornylacetatu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,862 až 0,877 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,475 až 1,480.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -4° až -16°.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Zbytek váží nejvýše 0,150 g.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná v jednom objemovém dílu *lihu 96%.*

Chromatografický profil. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 0,250 g *undekanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. *Zkoušený roztok*. 0,250 g se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml se smíchají s 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony délky 60 m a vnitřního průměru 0,53 mm s vnitřní stěnou pokrytou *poly[fenyl-(5)methyl(95)]siloxanem R;* tloušťka vrstvy 1,5 μm,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 10 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se zvyšuje ze 60 °C rychlostí 3 °C/min až na 190 °C,
- teploty nástřikového prostoru a detektoru 220 °C.

Nastříkne se 0,5 μl zkoušeného roztoku. Opakuje se nejméně třikrát. Při dodržení předepsaných podmínek se eluují jednotlivé látky v pořadí: α-pinen, kamfen, ß-pinen, myrcen, α-felandren, limonen, bornylacetat. Zkoušku lze hodnotit, jestliže symetrie píku je nejméně 0,8 a nejvýše 1,2, počítáno pro pík limonenu, a rozlišení mezi píky odpovídajícími cineolu a limonenu je nejméně 1,0. Obsah jednotlivých látek v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{P_i \cdot M_{VS} \cdot 100}{f \cdot P_{VS} \cdot M_S},$$

v němž značí:
P_i - plochu píku odpovídající látce i,
P_{vs} - plochu píku odpovídající undekanu,
M_{vs} - obsah undekanu v roztoku vnitřního standardu v gramech,
M_s - obsah silice ve zkoušeném roztoku v gramech,
f - korekční faktor pro porovnání odezvy undekanu a složky i.

Obsah látek v procentech:
- součet obsahů α-felandrenu a limonenu je nejméně 45 %,
- součet obsahů α-pinenu a ß-pinenu je nejvýše 40 %,
- obsah ostatních složek (jednotlivě) nejvýše 5 %.

Stanovení obsahu

5,000 g se smíchá s 20,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *modři thymolové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* odpovídá 98,15 mg $C_{12}H_{20}O_2$.

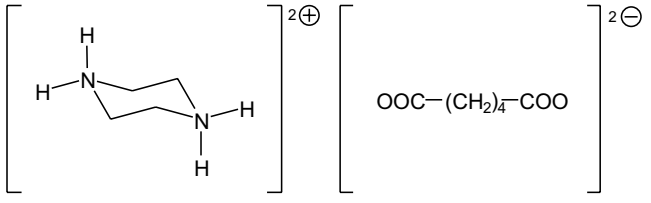
Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

† Piperazini adipas

Piperaziniumadipat

Synonymum. Piperazinium adipicum



$C_{10}H_{20}N_2O_4$ M_r 232,28 CAS 142-88-1

Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{20}N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.
Taje při asi 250 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *piperaziniumadipatu CRL*.

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují po postřiku roztoky ninhydrinu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. K 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a protřepe se třikrát s 10 ml *etheru R*. Spojené etherové výtřepky se odpaří do sucha. Zbytek promytý 5 ml *vody R* a vysušený při 100 °C až 105 °C taje *(2.2.14)* při 150 °C až 154 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_8 *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v 6 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *ethanolem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí na 10 ml směsí objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3).

Porovnávací roztok (a). 0,1 g *piperaziniumadipatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *ethylendiaminu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *triethylendiaminu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 12,5 mg *triethylendiaminu R* se rozpustí v 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se směsí objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3) na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se čerstvě připravenou směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *acetonu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 105 °C a postříká se postupně roztokem *ninhydrinu R* (3 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *1-butanolu R* (3 + 100) a roztokem *ninhydrinu R* (1,5 g/l) v *ethanolu R* a vrstva se suší 10 min při 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Vrstva se pak postříká *jodem 0,05 mol/l RS* a nechá se stát asi 10 min. Žádná skvrna odpovídající triethylendiaminu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jsou-li na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) dvě zřetelně oddělené skvrny. Neberou se v úvahu skvrny, které zůstanou na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R* a zředí se jí na 70 ml. Přidá se 0,25 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*, až se barva změní z hnědožluté na zelenou.

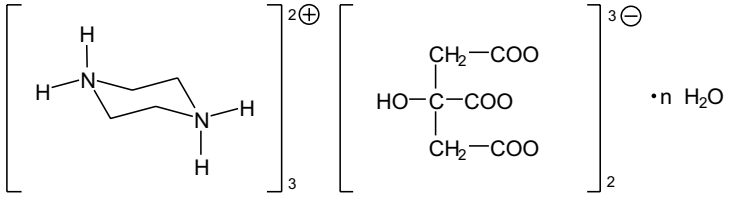
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,61 mg $C_{10}H_{20}N_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Piperazini citras

Piperaziniumcitrat



$C_{24}H_{46}N_6O_{14}$. nH_2O CAS 41372-10-5

M_r bezvodého 642,66

Je to hydratovaný tripiperazinium-bis(2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylat). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{24}H_{46}N_6O_{14}$. Obsahuje proměnlivé množství vody.

Vlastnosti

Bílý granulovaný prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Po vysušení při 100 °C až 105 °C taje při asi 190 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *piperaziniumcitratu CRL*. Zkoušená látka a referenční látka se suší 5 h při 120 °C, upráškují se za nepřístupu vlhkosti, připraví se tablety a ihned se měří spektra.

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují po postřiku roztoky ninhydrinu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml. Roztok vyhovuje zkoušce na citronany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_8 *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v 6 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *ethanolem R* na 10 ml.
Směs rozpouštědel. Při přípravě dalších roztoků se použije směs objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3).

Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí rozpouštědel na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *piperaziniumcitratu CRL* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *ethylendiaminu R* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *triethylendiaminu R* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 12,5 mg *triethylendiaminu R* se rozpustí v 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se směsí rozpouštědel na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *acetonu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 105 °C a postupně se postříká roztokem *ninhydrinu R* (0,03 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *1-butanolu R* (3 + 100) a roztokem *ninhydrinu R* (1,5 g/l) v *ethanolu R*. Pak se vrstva suší 10 min při 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Vrstva se postříká *jodem 0,05 mol/l RS* a nechá se stát asi 10 min. Skvrna odpovídající triethylendiaminu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jsou-li na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) dvě zřetelně oddělené skvrny. Nepřihlíží se ke skvrnám, které zůstanou na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 10,0 % až 14,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R* a zředí se jí na 70 ml. Přidá se 0,25 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*, až se barva změní z hnědožluté na zelenou.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,71 mg $C_{24}H_{46}N_6O_{14}$.

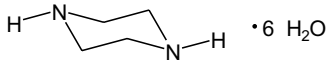
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

† Piperazinum hexahydricum

Hexahydrát piperazinu

Synonyma. Piperazinum hydricum, Piperazinum



$C_4H_{10}N_2 . 6H_2O$ M_r 194,23 CAS 142-63-2

M_r bezvodého 86,14

Obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_{10}N_2 . 6H_2O$.

Vlastnosti

Bezbarvé rozplývající se krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Taje při asi 43 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.

Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *hexahydrátu piperazinu CRL*. Zkoušená látka a referenční látka se suší 48 h ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškují se za nepřístupu vlhkosti, připraví se tablety a ihned se změří spektra.

B. Chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují po postřiku roztoky ninhydrinu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,5 g se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*. Přidá se 0,2 ml *benzoylchloridu R*, promíchá se a pak se pokračuje v přidávání *benzoylchloridu R* po 0,2 ml, až se netvoří další sraženina. Zfiltruje se a sraženina se promyje celkem 10 ml *vody R* rozdělené do malých dávek. Sraženina se rozpustí ve 2 ml horkého *lihu 96% R*, roztok se naleje do 5 ml *vody R* a nechá se stát 4 h. Pak se vzniklé krystaly odfiltrují, promyjí *vodou R* a vysuší při 100 °C až 105 °C. Tají (*2.2.14*) při 191 °C až 196 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_8 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 10,5 až 12,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g se rozpustí v 6 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *ethanolem R* na 10 ml.
Směs rozpouštědel. Při přípravě dalších roztoků se použije směs objemových dílů *ethanolu R* a *amoniaku 26% R* (2 + 3).
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí rozpouštědel na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *hexahydrátu piperazinu CRL* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *ethylendiaminu R* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *triethylendiaminu R* se rozpustí ve směsi rozpouštědel a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 12,5 mg *triethylendiaminu R* se rozpustí v 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se směsí rozpouštědel na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *acetonu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 105 °C a postupně se postříká roztokem *ninhydrinu R* (3 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *1-butanolu R* (3 + 100) a roztokem *ninhydrinu R* (1,5 g/l) v *ethanolu R*. Pak se vrstva suší 10 min při 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Vrstva se postříká *jodem 0,05 mol/l RS* a nechá se stát asi 10 min. Skvrna odpovídající triethylendiaminu na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jsou-li na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

80,0 mg se rozpustí mírným zahřátím v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R* a zředí se jí na 70 ml. Přidá se 0,25 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS*, až se barva změní z hnědožluté na zelenou.

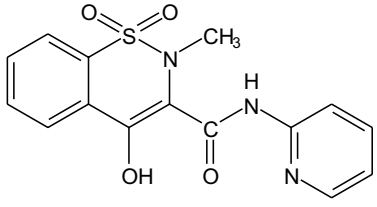
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,705 mg $C_4H_{10}N_2 . 6H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Piroxicamum

Piroxikam



$C_{15}H_{13}N_3O_4S$ M_r 331,4 CAS 36322-90-4

Je to 4-hydroxy-2-methyl-3-[(2-pyridyl)aminokarbonyl]-2*H*-1,2-benzothiazin-1,1-dioxid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{13}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v ethanolu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 mg se rozpustí v 80 ml *methanolu R*, přidá se 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *methanolem R* na 100,0 ml. 10,0 ml takto připraveného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 220 nm až 420 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 242 nm a 334 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 334 nm k absorbanci naměřené v maximu při 242 nm je 2,2 až 2,5.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *piroxikamu CRL*. Měří se roztoky látek (50 g/l) v *chloroformu R* v 0,1mm vrstvě.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,30 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 60,0 mg *piroxikamu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 50 ml.

Porovnávací roztok (c). 60 mg *2-pyridylaminu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající 2-pyridylaminu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající 2-pyridylaminu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

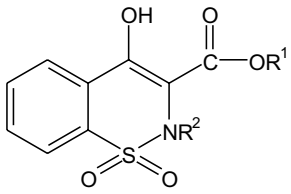
0,250 g se rozpustí v 60 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,14 mg $C_{15}H_{13}N_3O_4S$.

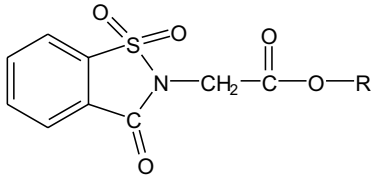
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

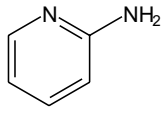
Nečistoty



A. $R^1 = CH_3$, $R^2 = H$; 4-hydroxy-3-methoxykarbonyl-2*H*-1,2-benzothiazin-1,1-dioxid,
B. $R^1 = C_2H_5$, $R^2 = H$; 3-ethoxykarbonyl-4-hydroxy-2*H*-1,2-benzothiazin-1,1-dioxid,
C. $R^1 = CH_3$, $R^2 = CH_3$; 4-hydroxy-3-methoxykarbonyl-2-methyl-2*H*-1,2-benzothiazin-1,1-dioxid,
D. $R^1 = C_2H_5$, $R^2 = CH_3$; 3-ethoxykarbonyl-4-hydroxy-2-methyl-2*H*-1,2-benzothiazin-1,1-dioxid,



E. $R = CH_3$; 1,1-dioxid methylesteru kyseliny 2-(3-oxo-1,2-benzothiazolin-2-yl)octové,
F. $R = C_2H_5$; 1,1-dioxid ethylesteru kyseliny 2-(3-oxo-1,2-benzothiazolin-2-yl)octové,

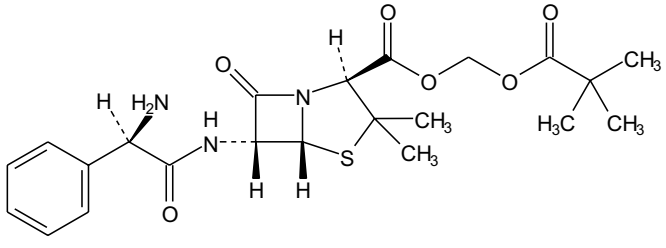


G. 2-pyridylamin.

† Pivampicillinum

Pivampicilin

1998



$C_{22}H_{29}N_3O_6S$ $_r$ 463,55 CAS 33817-20-8

Je to [(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]methylester kyseliny (6*R*)-6-(2-amino-2-fenylacetamido)penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{22}H_{29}N_3O_6S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v ethanolu. Rozpouští se ve zředěných kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *pivampicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného H R.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (a). 10 mg *pivampicilinu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*
Porovnávací roztok (b). 10 mg *pivampicilinu CRL*, 10 mg *bakampiciliniumchloridu CRL* a 10 mg *talampiciliniumchloridu CRL* se rozpustí ve 2 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů roztoku *octanu sodného R* (272 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou octovou ledovou R* na 5,0, *vody R* a *lihu 96% R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší proudem teplého vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 10 min na 60 C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chroma-

togramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnáva cího roztoku (b) jsou tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se převedou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a 15 mm v průměru. Zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je téměř bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 50 mg se rozpustí ve 12 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*. Roztok neopalizuje silněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_7 (*2.2.2, Metoda I*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +208° až +222°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v 5,0 ml *lihu 96% R* a zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*). *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v 10,0 ml *acetonitrilu R* a zředí se roztokem *kyseliny fosforečné R* (1 g/l) na 20 ml.
Porovnávací roztok. 2,0 ml zkoušeného roztoku se smíchá s 9,0 ml *acetonitrilu R* a 9,0 ml roztoku *kyseliny fosforečné R* (1 g/l).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii s vysycenými zbytkovými silanoly R*,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - směs objemových dílů roztoku *fosforečnanu amonného R* (1,32 g/l), jehož pH bylo upraveno roztokem *kyseliny fosforečné R* (100 g/l) na 2,5, a *acetonitrilu R* (50 + 50),
  - *mobilní fáze B* - směs objemových dílů roztoku *fosforečnanu amonného R* (1,32 g/l), jehož pH bylo upraveno roztokem *kyseliny fosforečné R* (100 g/l) na 2,5, a *acetonitrilu R* (15 + 85), s následujícím elučním programem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 10	100	0	izokraticky
10 - 12	0	100	izokraticky
12 - 17	100	0	znovuustavení

- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 50 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže kapacitní poměr dimeru pivampicilinu (s retenčním časem asi 5 min) a pivampicilinu (hlavní pík) je nejméně dvanáct. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 0,3násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (3 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k žádnému píku, jehož plocha je menší než 0,01násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g, stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 10 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS*. Zkumavka se zahřívá 10 min na vodní lázni, ochladí se a přidá se 15 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se vrchní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku se v zabroušené zkumavce přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. Je-li třeba, odstřeďuje se a použije se vrchní vrstva.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru 150 °C. Nastřikuje se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku.

Triethanolamin. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v 1,0 ml směsi objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (1 + 9).
Porovnávací roztok. 5,0 mg *triethanolaminu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (1 + 9) a zředí se touto směsí na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R*, *1-butanolu R*, *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 5,8*, *kyseliny octové ledové R* a *butylacetatu R* (5 + 15 + 24 + 40 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se 10 min suší při 110 °C a nechá se zchladnout. Do chromatografické komory se vloží odpařovací miska obsahující směs objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS*, *vody R* a roztoku *manganistanu draselného R* (15 g/l) (1 + 1 + 2). Komora se uzavře a nechá v klidu 15 min; poté se do ní vloží vysušená vrstva a komora se opět uzavře. Na vrstvu se nechají působit páry chloru po dobu 15 min až 20 min. Deska se vyjme, nechá se 2 min až 3 min stát na vzduchu a postříká se *zkoumadlem tetramethyldiaminodifenylmethanovým R*. Žádná skvrna odpovídající triethanolaminu na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,05 %).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 0,30 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*). *Roztoky se použijí do dvou hodin od přípravy*.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50,0 mg *pivampicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 25,0 mg *propyl-4-hydroxybenzoanu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml. 5,0 ml posledního roztoku se smíchá s 5,0 ml porovnávacího roztoku (a).

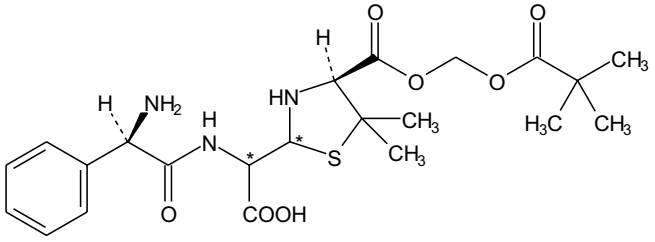
Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,125 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *kyseliny fosforečné R* (2,22 g/l), jejíž pH bylo upraveno *triethylaminem R* na 2,5, (40 + 60),
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Citlivost systému se nastaví tak, aby výška dvou hlavních píků na získaném chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (pivampicilin) a druhým píkem (propyl-4-hydroxybenzoan) je nejméně 5,0 a faktor symetrie píku pivampicilinu je nejvýše 2,0. Nastříkne se šestkrát 20 μl porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

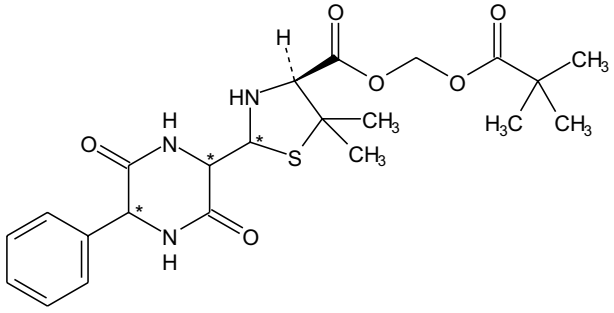
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

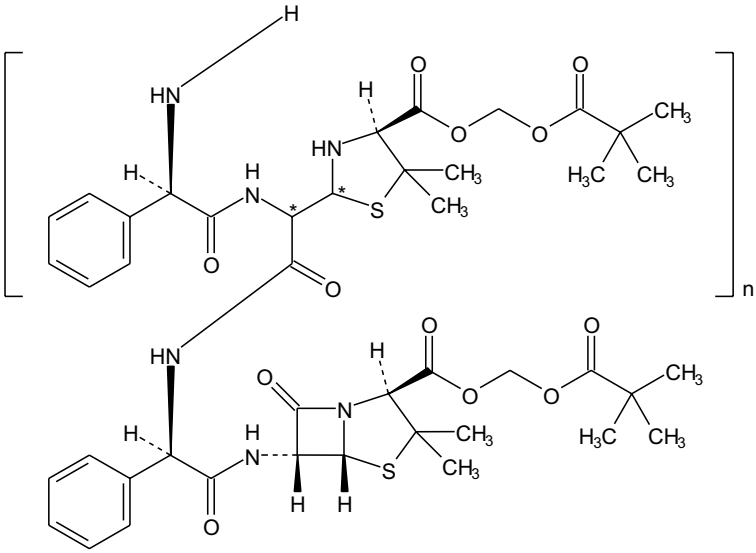
Nečistoty



A.kyselina2-{[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetyl]amino}-2-{(4*S*)-4-{[[(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]methoxy]karbonyl}-5,5-dimethylthiazolidin-2-yl}octová (penicilové kyseliny pivampicilinu),



B.[(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]methyl-(4*S*)-[5,5-dimethyl-2-(5-fenyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)thiazolidin-4-karboxylat] (diketopiperazin pivampicilinu),



C. ko-oligomery pivampicilinu a penicilových kyselin pivampicilinu.

Plantaginis folium

N

Jitrocelový list

Synonymum. Folium plantaginis

Je to usušený list druhu *Plantago lanceolata* L.

Vlastnosti

Droga slabého charakteristického pachu, mírně hořké, poněkud svíravé chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. List kopinatý, někdy až čárkovitě kopinatý, až 30 cm dlouhý a 4 cm široký, olysalý nebo chlupatý, zúžený dole v krátký žlábkovitý řapík. Čepel celokrajná, zřídka oddáleně mělce zubatá, zelená, šedozelená nebo hnědozelená, na bázi někdy fialově naběhlá. Žilnatina rovnoběžná, se třemi až sedmi naspod ostře vyniklými žilkami.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka z buněk se stěnami tenkými, vlnitě zprohýbanými, krytá hladkou kutikulou. Na obou stranách listu převládají průduchy diacytické (*2.8.3*), kromě nich se vyskytují i průduchy anomocytické (*2.8.3*). Krycí chlupy mnohobuněčné, jednořadé, bazální buňka téměř kulovitá, nasedá na zvětšenou buňku pokožky, další dvě buňky jsou dlouhé, čípkovité, výrazně ztlustlé,s luminem vláknitým. Řidčeji se vyskytují mnohobuněč-

né, jednořadé, velmi dlouhé, zprohýbané chlupy s buňkami často kolabovanými. Žláznaté chlupy s jednobuněčnou kuželovitou nohou a víceřadou hlavičkou z drobných buněk, ukončenou jednou špičatou buňkou koncovou. List monofaciální. Palisádový parenchym na svrchní straně nejvýše třířadý, na spodní straně nejvýše dvouřadý, houbový parenchym mohutný. Přechod mezi jednotlivými vrstvami parenchymu nezřetelný.

C. Práškovaná droga. Prášek je nahnědle zelený. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s diacytickými a anomocytickými průduchy (*2.8.3*); krycí chlupy nebo jejich úlomky s bazální buňkou téměř kulovitou, následujícími dvěma buňkami dlouhými, čípkovitými, výrazně ztlustlými s vláknitým luminem, mnohobuněčné, velmi dlouhé zprohýbané chlupy s buňkami často kolabovanými; žláznaté chlupy s jednobuněčnou kuželovitou nohou a víceřadou hlavičkou z drobných buněk ukončenou jednou špičatou koncovou buňkou.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 5 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem při 65 °C. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 5 mg *žluti naftolové SR* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny octové ledové R* a *ethylacetatu R* (20 + 20 + 60) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu. Pak se postříká *dimethylaminobenzaldehydem RS2* a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní hnědošedá skvrna (aukubin), která se barví modrošedě v poloze přibližně odpovídající skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, méně intenzivní skvrny odpovídající zbarvením aukubinu; na čele chromatogramu je intenzivně zbarvená skvrna (chlorofyl).

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2,0 %; nejvýše 12,0 % jinak zbarvené drogy; nejvýše 5,0 % jiných částí matečné rostliny; nejvýše 1,0 % anorganických příměsí.

Záměny.

A. Nejsou přítomny listy nevýrazně zelené, podlouhle kopinaté, celokrajné, lysé, na okraji brvité, až 20 cm dlouhé a až 3 cm široké, na spodní straně s vyniklou hlavní žilkou a souběžnými žilkami prvního řádu.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Nejsou patrny buňky pokožky mnohohranné až slabě zvlněné, s nepravidelně uzlinovitě ztlustlými stěnami, kryté jemně zrnitou kutikulou; průduchy na obou stranách listu téměř okrouhlé, bez typických vedlejších buněk; v okolí žilnatiny roztroušené hlavičkovité chlupy s jednobuněčnou nohou a většinou dvoubuněčnou hlavičkou; krycí chlupy dlouhé, mnohobuněčné.

List bifaciální. Palisádový parenchym dvouřadý až třířadý, z buněk krátkých, se stěnami mírně vlnitě zprohýbanými; houbový parenchym víceřadý. Krystaly šťavelanu vápenatého a sklerenchymatická vlákna chybějí (*Digitalis lanata* EHRH.).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 4,0 %.

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 6,0; stanoví se s 1,0 g práškované drogy (355).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Plasma humanum ad separationem

Lidská plazma pro frakcionaci

Je to tekutá část lidské krve zbývající po oddělení buněčných elementů z krve odebrané do antikoagulačního roztoku nebo oddělená průběžnou filtrací nebo odstřeďováním během plazmaferézy. Je určena k výrobě krevních derivátů.

Výroba

K odběru krve nebo krevní plazmy se mohou použít pouze pečlivě vybraní zdraví dárci, u nichž je co možná nejvíce zjištěno lékařskou prohlídkou, laboratorními rozbory krve a z anamnézy, že jsou prosti zjistitelných původců těch nákaz, které se mohou přenést transfuzí krve nebo jejích složek. Jako dárci krve nejsou přijatelné osoby, které byly léčeny látkami pocházejícími z lidské hypofýzy, jako jsou např. růstový hormon, gonadotropin, hormon stimulující štítnou žlázu (thyreotropin).

O vyšetřeních a zkouškách, jež se mají provést, a o postupech při odběru krve nebo plazmaferéze rozhoduje příslušná autorita té země, ve které se odběr uskutečňuje. Doporučení v této oblasti dala komise expertů Rady Evropy pro krevní transfuzi a imunohematologii, např. *Guide for the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, Council of Europe, Strasbourg 1995 a Světová zdravotnická organizace (např. *Requirements for the Collection, Processing and Quality Control of Blood, Blood Components and Plasma Derivatives*, Requirements for Biological Substances No. 27, WHO, Technical Report Series No. 840, 1994).

Při každém odběru se zejména provedou zkoušky na povrchový antigen hepatitidy B, na protilátky proti viru hepatitidy C a na protilátky proti HIV metodami s vhodnou citlivostí a specificitou a v každém případě se zjistí negativní výsledek. Plazma dárce obsahuje v době odběru nejméně 60 g celkových bílkovin v litru. Stanovení hladiny sérových bílkovin dárce se provádí ve vhodných intervalech.

Plazma se připravuje metodou, která co možná nejdokonaleji odstraňuje krevní buňky a jejich části. Ať se připravuje z lidské krve nebo plazmaferézou, odděluje se plazma od buněk metodou, která umožní vyloučit kontaminaci mikroorganismy. Nepřidává se žádná protimikrobní konzervační látka. Obaly vyhovují požadavkům na skleněné obaly (*3.2.1*) nebo na krevní vaky z plastů (*3.2.3/4/5/6*). Obaly jsou uzavřeny tak, aby se předešlo kontaminaci.

Spojování plazmy dvou nebo více dárců je povoleno pouze tehdy, když se provede za aseptických podmínek a směs se ihned a rychle zmrazí na teplotu -30 °C nebo nižší. Obaly, které byly dříve použity pro jiné účely, se nesmí použít pro smíšenou plazmu. Plazma získaná z plné krve a určená pro výrobu koagulačních faktorů nebo jiných labilních složek se oddělí od buněk co nejdříve, nejpozději však do 24 h od odběru. Plazma pro výrobu koagulačních faktorů a jiných labilních složek se zpracuje krátce po oddělení nebo odběru nebo se šokově zmrazí na teplotu -30 °C nebo nižší. Plazma určená pro výrobu těch složek, které nejsou labilní, se oddělí do pěti dnů od ukončení použitelnosti plné krve.

Není určeno, aby se stanovení celkové bílkoviny a faktoru VIII provádělo u každé jednotky plazmy. To je spíše dáno zásadami správné výrobní praxe; stanovení účinnosti faktoru VIII je důležité pro plazmu určenou pro přípravu koncentrátů labilních složek.

Obsah celkových bílkovin v jednotce plazmy závisí na obsahu sérových bílkovin dárce a na stupni naředění během odběru. Když je plazma získána od vhodného dárce a odebrána do zamýšleného množství antikoagulačního roztoku, získá se obsah celkových bílkovin, který vyhovuje hranici 50 g/l. Když je do antikoagulačního roztoku odebrán objem krve nebo plazmy menší než původně zamýšlený, nemusí výsledná plazma být nezbytně nevhodná pro smíchání k frakcionaci. Cílem správné výrobní praxe je dosažení předepsaného limitu pro všechny normální odběry.

Obsah faktoru VIII v plazmě závisí na postupu při odběru a na dalším zacházení s krví a plazmou. Při správné praxi se obvykle dosahuje koncentrace 0,7 m.j. v mililitru, ale i plazma s nižším obsahem se může použít k výrobě koncentrátů koagulačních faktorů. Cílem správné výrobní praxe je zachovat taková množství labilních složek, kolik je možno.

Celkový obsah bílkovin. Nejméně 50 g/l. Stanoví se ve směsi nejméně deseti odběrů, která se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby výsledný roztok obsahoval ve 2 ml asi 15 mg bílkovin. Ke 2,0 ml tohoto roztoku v centrifugační zkumavce s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi, která obsahuje 1 objemový díl *kyseliny sírové prosté dusíku R* a 30 objemových dílů *vody R*. Protřepe se, 5 min se odstřeďuje, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Faktor VIII. Nejméně 0,7 m.j./ml. Stanoví se ve směsi nejméně deseti odběrů, které se, je-li třeba, nechají roztát při teplotě nižší než 37 °C. Stanovení účinnosti faktoru VIII (*2.7.4*) se provede za použití porovnávací plazmy kalibrované na mezinárodní referenční přípravek pro stanovení účinnosti vztažené na krevní koagulační faktor VIII v plazmě.

Během frakcionace krevních derivátů se první homogenní směs plazmy (např. po odstranění kryoprecipitátu) zkouší na povrchový antigen hepatitidy B, protilátky proti hepatitidě C a na látky proti HIV metodami s vhodnou citlivostí a specificitou; směs dává negativní výsledky.

Vlastnosti

Před zmrazením čirá nebo slabě zakalená tekutina, jejíž barva je světle žlutá až zelená.

Zkoušky totožnosti

Není určeno, aby se tyto zkoušky prováděly u každého odběru, ale pouze tehdy, když je třeba ověřit totožnost plazmy, včetně jejího lidského původu.

A. Zkoušený přípravek se nechá roztát při teplotě nižší než 37 °C. K 1 ml se ihned přidá 0,2 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (25 g/l). Koagulace může být urychlena zahřátím na 37 °C. Směs se po koagulaci odstřeďuje, supernatantní tekutina se použije pro zkoušku B.

B. Supernatantní tekutina ze zkoušky A se zkouší imunoelektroforézou sérem proti lidským bílkovinám. Výsledné precipitační linie vykazují hodnoty typické pro lidské sérové bílkoviny.

C. S rozmrzlou plazmou se provedou precipitační zkoušky s použitím řady vhodných druhově specifických antisér. Doporučuje se použít antiséra specifická na plazmatické bílkoviny všech druhů domácích zvířat v příslušném státě běžně používaných k přípravě materiálů biologického původu. Prokážou se bílkoviny lidského původu a antiséra specifická na plazmatické bílkoviny jiných druhů dávají negativní výsledky.

D. Stanovení krevního koagulačního faktoru VIII rovněž přispívá k potvrzení totožnosti plazmy pro výrobu koncentrátů faktoru VIII.

Uchovávání

Mražená plazma se uchovává při teplotě -25 °C nebo nižší. Při přepravě, která netrvá déle než 4 týdny, se udržuje teplota nižší než -20 °C. Tato teplota se během přepravy udržuje pokud možno po celou její dobu, pro frakcionaci se může použít ještě plazma, u které jen jedenkrát teplota překročila -20 °C, a to nejvýše na 72 h, přičemž nikdy nebyla vyšší než -5 °C.

Tekutá plazma se uchovává a přepravuje při 2 °C až 8 °C.

Označování

Označování se řídí odpovídajícími národními předpisy a mezinárodními pravidly.

Doporučení v této oblasti dala komise expertů Rady Evropy pro krevní transfuzi a imunohematologii (např. *Guide for the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, Council of Europe, Strasbourg 1992) a Světová zdravotnická organizace (např. *Requirements for the Collection, Processing and Quality Control of Blood, Blood Components and Plasma Derivatives*, Requirements for Biological Substances No. 27, WHO, Technical Report Series No. 840, 1994).

Označení umožňuje identifikaci každého jednotlivého dárce.

† Plumbi acetas

N

Octan olovnatý

$(CH_3COO^-)_2Pb^{2+} . 3H_2O$

$C_4H_6O_4Pb . 3H_2O$ M_r 379,33 CAS 6080-56-4

M_r bezvodého 325,29

Je to trihydrát octanu olovnatého. Obsahuje 99,5 % až 104,5 % sloučeniny $C_4H_6O_4Pb . 3H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, slabého pachu po kyselině octové. Na vzduchu zvětrává, přijímá oxid uhličitý a přechází v zásaditý uhličitan. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v glycerolu 85%.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhovuje zkouškám na olovo (*2.3.1*).

B. Vyhovuje zkouškám na octany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve 40 ml *vody R* okyselené 0,15 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 8 ml roztoku *kyseliny sírové R* (250 g/l), promíchá se a po 15 min se zfiltruje. Filtr se propláchne *vodou R* tak, aby celkový objem filtrátu činil 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Látky nerozpustné ve vodě. 10,0 g se rozpustí ve 200 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* okyselené 2 ml *kyseliny octové ledové R*. Zahřívá se 5 min na vodní lázni a po ochlazení se zfiltruje vysušeným a předem zváženým filtrem ze slinutého skla (S4). Zbytek na filtru se promyje 100 ml horké *vody R* okyselené 1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a suší se 1 h při 105 °C. Zbytek váží nejvýše 1 mg (0,01 %).

Volná kyselina octová. 1,00 g se rozpustí v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R,* přidá se roztok 1,0 g *síranu sodného bezvodého R* v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a 0,50 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně.

Měď. K 5 ml roztoku S se přidá 1 ml *amoniaku 26% R*. Do 5 min se roztok nezbarví intenzivněji než kontrolní roztok připravený z 5,0 ml *vody R* a 1 ml roztoku *amoniaku 26% R*.

Železo (*2.4.9*). 10,0 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Chloridy (*2.4.4*). 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (20 μg/g). Použije se porovnávací roztok (1 μg Cl/ml) připravený zředěním základního *roztoku chloridů (5 μg Cl/ml)*.

Soli alkálií a alkalických zemin. 20 ml roztoku S se odpaří ve vyžíhané a předem zvážené misce na vodní lázni do sucha. Zbytek vyžíhaný do konstantní hmotnosti váží nejvýše 1 mg (0,1 %).

Stanovení obsahu

0,7000 g se rozpustí v 50 ml *vody R* okyselené 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a provede se chelatometrické stanovení olova *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 37,93 mg $C_4H_6O_4Pb \cdot 3H_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

Polyacrylatis dispersio 30%

Polyakrylátová disperze 30%

Je to vodná disperze kopolymeru ethylakrylatu a methylmethakrylatu se střední relativní molekulovou hmotností asi 800 000. Může obsahovat vhodný emulgátor. Zbytek po odpaření je 28,5 % až 31,5 %.

Vlastnosti

Neprůhledná bílá slabě viskózní kapalina. Je mísitelná s vodou, dobře rozpustná v acetonu, v ethanolu a 2-propanolu. Podléhá snadno mikrobiálnímu znečištění.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem polyakrylatu Ph. Eur.*

B. K 1 g se přidá 5 ml *vody R* a promíchá se; směs zůstává neprůhledná. Tři 1g podíly se odděleně smíchají s 5 g *ethanolu R*, *acetonu R* a *2-propanolu R;* získají se průhledné roztoky.

C. K 1 g se přidá 10 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS*. Směs zůstává neprůhledná.

D. Zkouška Vzhled filmu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

E. V Petriho misce se suší 4 g v sušárně při 60 °C po dobu 4 h a výsledný čirý film se přenese do malé zkumavky (100 mm x 12 mm). Zkumavka s filmem se zahřívá nad plamenem a vznikající dýmy se jímají v druhé zkumavce držené blízko ústí první. Kondenzát vyhovuje zkoušce na estery (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota (*2.2.5*). 1,037 až 1,047.

Zdánlivá viskozita (*2.2.10*). Nejvýše 50 mPa.s; stanoví se pomocí rotačního viskozimetru při 20 °C a při smykové rychlosti 10 s^{-1}.

Vzhled filmu. 1 ml se naleje na skleněnou desku a nechá se vyschnout. Vznikne čirý elastický film.

Pevné částice. 100,0 g se zfiltruje přes zvážené nerezové ocelové síto (90). Promývá se *vodou R*, dokud se nezíská čirý filtrát, a vysuší se při 80 °C do konstantní hmotnosti. Hmotnost zbytku není větší než 0,500 g.

Zbytkové monomery. Nejvýše 0,1 %; stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí v *tetrahydrofuranu R* a zředí se jím na 50,0 ml. K 5,0 ml roztoku *chloristanu sodného R* (35 g/l) se za neustálého míchání po kapkách přidává 10,0 ml roztoku. Odstřeďuje se a 5,0 ml čiré supernatantní tekutiny se zředí *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *ethylakrylatu R* a 10 mg *methylmethakrylatu R* se rozpustí v *tetrahydrofuranu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *tetrahydrofuranem R* na 50,0 ml. K 10,0 ml konečného roztoku se přidá 5,0 ml roztoku *chloristanu sodného R* (35 g/l) a promíchá se, 5,0 ml této směsi se zředí *vodou R* na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony 0,12 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (15 + 85). Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 205 nm.

Nastříknou se odděleně stejná množství (asi 50 μl) každého roztoku.

Vypočítá se obsah monomerů v procentech za použití ploch píků na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a z obsahu monomerů v porovnávacím roztoku.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Zbytek po odpaření. 1,000 g se suší 3 h při 110 °C. Zbytek váží 0,285 g až 0,315 g.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,4 %, stanoví se s 1,00 g látky.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu. Stanoví se plotnovou metodou.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech při teplotě 5 °C až 25 °C, chráněn před mrazem. S látkou se zachází tak, aby bylo minimalizováno mikrobiální znečištění.

Označování

V označení na obalu se uvede název a koncentrace přidaného emulgátoru.

Polygalae radix

Senegový kořen

Synonymum. Radix polygalae

Jsou to zpravidla úlomky usušeného kořene a kořenových hlav druhu *Polygala senega* L. nebo jiných příbuzných druhů nebo směs druhů rodu *Polygala.*

Vlastnosti

Droga nasládlého, lehce zažluklého pachu nebo pachu po methylsalicylatu. Práškovaná droga dráždí a nutí k dávení. Po protřepání s vodou silně pění.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Kořenová hlava je šedohnědá, širší než kořen, nepravidelného tvaru, s četnými zbytky stonků a s přitisklými, červenohnědými pupeny. Kořen je hnědý až žlutý, zřídka větvitý, někdy zahnutý, zpravidla zkroucený, bez postranních kořenů, výjimku tvoří japonské odrůdy a druhy, které mají četné vláknité kořínky. Průměr u kořenové hlavy je obvykle 1 mm až 8 mm, ke konci se postupně zužuje. Povrch podélně a příčně rýhovaný, často s více nebo méně zřetelně vyvinutým, protáhle šroubovitým kýlem. Lom je krátký; na lomu je patrna nažloutlá kůra různé tloušťky obklopující v závislosti na druhu matečné rostliny okrouhlé nebo nepravidelné světleji zbarvené dřevo.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Na příčném řezu je patrný několikavrstevný korek tvořený tenkostěnnými buňkami; buňky felodermu slabě kolenchymaticky ztlustlé, obsahující olejové kapky; lýko a dřevo má zejména v blízkosti kořenové hlavy obvyklé uspořádá

ní; tam, kde je vytvořen kýl, je patrné silně vyvinuté lýko, kromě toho se mohou vyskytnout i další anomálie v důsledku vzniku jednoho nebo dvou kýlovitých paprsků v lýku a dřevu, parenchymatické buňky paprsku obsahují kapky oleje. Dřevo většinou centrální, tvořené cévami o průměru až 60 μm, provázenými četnými tenkostěnnými cévicemi a několika malými zdřevnatělými parenchymatickými buňkami.

C. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: podlouhlé úlomky zdřevnatělého pletiva tvořeného tečkovanými cévicemi a poněkud širšími cévami s četnými dvůrky nebo cévami síťovitě ztlustlými; nažloutlý parenchym a kolenchymatické buňky obsahující kapky oleje; někdy úlomky korku a úlomky pokožky s průduchy a jednobuněčnými chlupy pocházejícími ze šupin pupenů. Krystaly šťavelanu vápenatého a sklereidy chybějí.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se vaří 15 min pod zpětným chladičem s 10 ml *lihu* 70% (*V/V*), zfiltruje se a nechá se vychladnout.
Porovnávací roztok. 10 mg *escinu R* se rozpustí v *lihu* 70% (*V/V*) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl a 40 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (10 + 40 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se při 100 °C až 105 °C do objevení červených skvrn (saponiny). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve spodní a střední části tři až pět červeně zbarvených skvrn, které odpovídají polohou šedofialovým skvrnám escinu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká 10 ml roztoku *kyseliny fosfomolybdenové R* (200 g/l) v *lihu 96% R* a suší se při 100 °C až 105 °C, dokud se skvrny odpovídající saponinům nezbarví modře. Intenzita a velikost skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku je vymezena skvrnami escinu při nanášce 10 μl a 40 μl na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 3,0 %.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

Polygoni avicularis herba

N

Truskavcová nať

Synonymum. Herba polygoni avicularis

Je to usušená kvetoucí nať druhu *Polygonum aviculare agg.*

Vlastnosti

Droga bez pachu, chuti mírně svíravé.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Stonek větvený, válcovitý nebo nevýrazně hranatý, podélně rýhovaný, šedozelený. Články stonku asi 2 cm dlouhé. Palisty srostlé v botku objímající bázi článku nad uzlinou. Botka suchomázdřitá, stříbřitě lesklá, na bázi nahnědlá. Střídavé listy přisedlé nebo jen velmi krátce řapíkaté, celokrajné, lysé nebo jen na okraji slabě brvité, vejčitě kopinaté až oválné, až 3 cm dlouhé, s hlavní žilkou na spodní straně vyniklou. Květy jednotlivé nebo v chudých svazečcích po dvou až šesti v úžlabí listenů podobných listům. Stopky květní kratší než okvětí. Okvětí pětičetné, nejvýše do poloviny srostlé, zelenobílé. Ušty růžově nebo bíle lemované. Nažky hnědé až černé, lesklé, hladké, trojboké, se všemi stranami vydutými, uzavřené v okvětí.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka stonku z buněk mnohohranných, s jemně rýhovanou kutikulou. Hypodermis nesouvislá, tvoří izolované pruhy silně ztlustlých vláken. Primární kůra úzká, parenchymatické buňky okrouhlé, v obvodové části s chloroplasty, ostatní s četnými velkými drúzami šťavelanu vápenatého. Endodermis jednořadá z buněk velkých, ztlustlých. Kolaterální svazky cévní v izolovaných skupinách. Dřeň parenchymatická, s nápadně velkými růžicovitými krystaly šťavelanu vápenatého. Pokožka listu z buněk mnohohranných nebo se stěnami mírně vlnitě zprohýbanými, s kutikulou hustě rýhovanou. Průduchy anizocytického typu (*2.8.3*) na obou stranách listu. List monofaciální. Palisádový parenchym jednořadý, na svrchní straně z buněk delších, na spodní straně z buněk kratších. Houbový parenchym s četnými drúzami šťavelanu vápenatého různé velikosti. Kolaterální cévní svazky provázeny dvěma pruhy kolenchymu. Pylová zrna kulovitá, o průměru 27 μm až 35 μm, se třemi klíčními póry a s hladkou exinou. Exokarp semen z hnědých kamenných buněk se stěnami silně vlnitě zprohýbanými. Osemení tenké, kožovité. Endosperm parenchymatický, obvodová vrstva s aleuronovými zrny, vnitřní vrstva s jednoduchými, mnohohrannými 3 μm až 7 μm velkými škrobovými zrny.

C. Práškovaná droga. Prášek je šedozelený. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky stonku se ztlustlými hypodermálními vlákny, kolaterálními cévními svazky, velkými drúzami šťavelanu vápenatého; úlomky monofaciálních listů s anizocytickými průduchy (*2.8.3*) a s četnými drúzami šťavelanu vápenatého v houbovém parenchymu. Pylová zrna kulovitá, o průměru 27 μm až 35 μm, se třemi klíčními póry a s hladkou exinou.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1,0 %, nejvýše 3,0 % jinak zbarvené drogy, nejvýše 3,0 % jiných částí matečné rostliny a nejvýše 1,0 % anorganických příměsí.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Uchovávání

V uzavřených obalech, chráněna před světlem a vlhkostí.

† Polymyxini B sulfas

Polymyxin-B-sulfat

CAS 1405-20-5

Je to směs síranů polypeptidů produkovaných určitými kmeny *Bacillus polymyxa* nebo získaných jiným způsobem. Účinnost je nejméně 6500 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*. Roztok se zahřívá 5 h při 135 °C v dobře utěsněné zkumavce. Potom se roztok odpaří do sucha na vodní lázni a zahřívá se do úplného vymizení pachu po kyselině chlorovodíkové a zbytek se rozpustí v 0,5 ml *vody R*.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *leucinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *threoninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *fenylalaninu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 20 mg *serinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Následující postup se provede za ochrany před světlem.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku do 10mm pruhů. Deska s vrstvou se přenese do chromatografické komory tak, aby nepřišla do styku s mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *fenolu R* (25 + 75). Vrstva se nechá nejméně 12 h v parách mobilní fáze a potom se vyvíjí stejnou mobilní fází po dráze 12 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C, postříká se *ninhydrinem RS1* a potom se 5 min zahřívá při 110 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny, které odpovídají skvrnám na chromatogramu porovnávacích roztoků (a), (b) a (c), a žádná skvrna neodpovídá skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (d). Chromatogram zkoušeného roztoku dále vykazuje skvrnu s velmi malou hodnotou R_F (kyselina 2,4-diaminomáselná).

B. Asi 2 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidá se 5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l), protřepe se a po kapkách se přidá 0,25 ml roztoku *síranu měďnatého R* (10 g/l); vzniká červeno-fialové zbarvení.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,2 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -78° až -90°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,50 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Fenylalanin. 9 % až 12 %, počítáno na vysušenou látku. 0,375 g (*m* g) se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) v maximech při 264 nm (A_{264}), 258 nm (A_{258}) a 252 nm (A_{252}) a při 300 nm (A_{300}) a 280 nm (A_{280}). Obsah fenylalaninu v procentech se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{9{,}4787}{m}(A_{258} - 0{,}5A_{252} + 0{,}5A_{264} - 1{,}8A_{280} + 0{,}8A_{300}) \ .$$

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 6,0 %; 1,00 g se 3 h suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,75 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sírany. 15,5 % až 17,5 %, počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a pH roztoku se upraví *amoniakem 26 % R* na hodnotu 11. Přidá se 10,0 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *ftaleinpurpuru R*. Titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se barva roztoku začíná měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud modrofialové zbarvení nezmizí.

1 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranu (SO_4).

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu k odstranění pyrogenních látek, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne 1,5 mg zkoušené látky rozpuštěné v 1 ml *vody na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

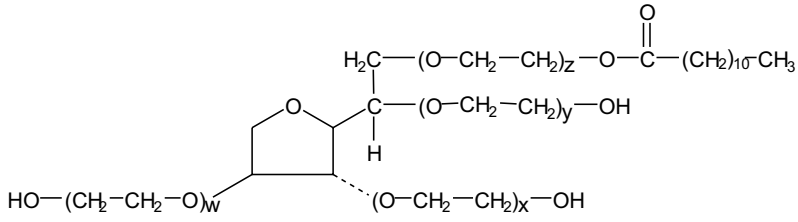
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá pyrogenních látek.

Polysorbatum 20

Polysorbát 20



w + x + y + z = 20

CAS 9005-64-5

Je to směs parciálních esterů kyseliny laurové a sorbitolu a jejich anhydridů kopolymerizovaných přibližně s 20 moly ethylenoxidu na každý mol sorbitolu a sorbitolanhydridu. Kyselina laurová používaná k esterifikaci může obsahovat jiné mastné kyseliny.

Vlastnosti

Olejovitá nažloutlá až nahnědle žlutá čirá nebo mírně opalizující kapalina. Je mísitelný s vodou, s ethanolem, s ethylacetatem a s methanolem, prakticky nerozpustný v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Relativní hustota je asi 1,10.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí při asi 50 °C ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Při třepání roztok silně pění. Přidá se 0,5 g *chloridu sodného R* a zahřeje se k varu. Vzniklý zákal zmizí během ochlazení na asi 50 °C.

B. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Po ochlazení na asi 80 °C se přidá 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zahřívá se asi 10 min pod zpětným chladičem do odstranění emulze; mastná kyselina se oddělí na povrchu jako olejovitá kapalina. Po ochlazení na pokojovou teplotu se mastná kyselina bez protřepání přenese do dělicí nálevky za použití 50 ml *etheru petrolejového R*. Organická vrstva se promyje třikrát 5 ml *vody R*. Organická vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 245 až 300; stanoví se s 0,30 g.

C. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*. Přidá se 0,1 g *thiokyanatanu draselného R* a 0,1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a míchá se skleněnou tyčinkou; roztok zmodrá.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g rozpuštěnými v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 96 až 108; stanoví se s 2,0 g (Metoda A).

Číslo jodové (*2.5.4*). Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 40 až 50; stanoví se s 2,0 g. Použije se 15,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS*, před provedením titrace se zředí 50 ml *lihu 96% R*.

Redukující látky. 2,00 g se rozpustí ve 25 ml horké *vody R*, přidá se 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *feroinu RS*. Titruje se *hexanitratoceričitanem amonným 0,01 mol/l VS* za stálého protřepávání do změny červeného zbarvení na zelenomodré, které je stálé 30 s. Provede se slepá zkouška. Spotřebují se nejvýše 2,0 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,01 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %. Ke 2,00 g v křemenném nebo platinovém kelímku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 2 h na vodní lázni. Opatrně se žíhá při nízké teplotě do úplného zuhelnatění. K zuhelnatělé hmotě se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R*, opatrně se zahřívá, dokud se uvolňují bílé dýmy, a žíhá se při teplotě 600 °C do vymizení všech černých částí. Nechá se vychladnout, zváží se a žíhání se opakuje vždy po 15 min do konstantní hmotnosti.

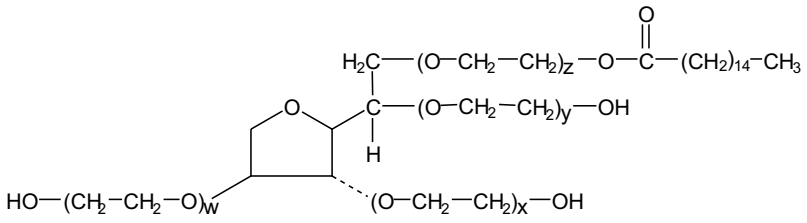
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Polysorbatum 40

N

Polysorbát 40



w + x + y + z = 20

CAS 9005-66-8

Je to směs parciálních esterů kyseliny palmitové a sorbitolu a jeho anhydridů kopolymerizovaných přibližně s 20 moly ethylenoxidu na každý mol sorbitolu a sorbitolanhydridu.

Vlastnosti

Olejovitá slabě nažloutlá tekutina nebo gelovitá průsvitná hmota, která se stává tekutou při teplotě asi 25 °C. Je mísitelný s vodou, s ethanolem, s ethylacetatem a s methanolem, prakticky nerozpustný v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Relativní hustota je asi 1,08.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí při asi 50 °C ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Při třepání roztok silně pění. Přidá se 0,5 g *chloridu sodného R* a zahřeje se k varu; vzniklý zákal zmizí během ochlazení na asi 50 °C.

B. 0,3 g se smíchá v 50ml kádince s 5 ml *vody R,* přidá se 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a asi 3 min se vaří. K ještě horkému roztoku se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 10% RS;* vznikne bílý zákal.

C. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*. Přidá se 0,1 g *thiokyanatanu draselného R* a 0,1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a míchá se skleněnou tyčinkou; roztok se zbarví modře.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 2,2; stanoví se s 5,0 g rozpuštěnými v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 89 až 105; stanoví se s 2,0 g (Metoda A).

Číslo jodové (*2.5.4*). Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 41 až 52; stanoví se s 2,0 g. Použije se 15,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS*. Před provedením titrace se zředí 50 ml *vody R*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

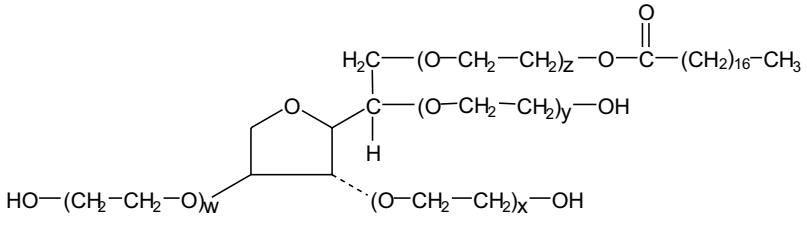
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %. Ke 2,00 g v křemenném nebo platinovém kelímku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 2 h na vodní lázni. Potom se opatrně spaluje při nízké teplotě do úplného zuhelnatění. K zuhelnatělé hmotě se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R*, opatrně se zahřívá, dokud se uvolňují bílé dýmy, a potom se žíhá při teplotě 600 °C do vymizení všech černých částic. Nechá se vychladnout, zváží se a žíhání se opakuje vždy po 15 min do konstantní hmotnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Polysorbatum 60

Polysorbát 60



w + x + y + z = 20

CAS 9005-67-8

Je to směs parciálních esterů kyseliny stearové a sorbitolu a jejich anhydridů kopolymerizovaných přibližně s 20 moly ethylenoxidu na každý mol sorbitolu a sorbitolanhydridu. Kyselina stearová používaná k esterifikaci může obsahovat další mastné kyseliny, zvláště kyselinu palmitovou.

Vlastnosti

Nažloutle hnědá gelovitá hmota, která se stává čirou kapalinou při teplotě nad asi 25 °C. Je mísitelná s vodou, s ethanolem, s ethylacetatem a s methanolem, prakticky nerozpustná v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Relativní hustota je asi 1,10.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí při asi 50 °C ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Při třepání roztok silně pění. Přidá se 0,5 g *chloridu sodného R* a zahřeje se k varu. Vzniklý zákal zmizí během ochlazení na asi 50 °C.

B. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Po ochlazení na asi 80 °C se přidá 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zahřívá se asi 10 min pod zpětným chladičem do odstranění emulze; mastná kyselina se oddělí na povrchu jako olejovitá kapalina. Po ochlazení na pokojovou teplotu se mastná kyselina přenese bez protřepání do dělicí nálevky za použití 50 ml *etheru petrolejového R*. Organická vrstva se promyje třikrát 5 ml *vody R*. Organická vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 190 až 220; stanoví se s 0,50 g.

C. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*. Přidá se 0,1 g *thiokyanatanu draselného R* a 0,1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a míchá se skleněnou tyčinkou; roztok zmodrá.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g rozpuštěnými v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 81 až 96; stanoví se s 2,0 g (Metoda A).

Číslo jodové (*2.5.4*). Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 45 až 55; stanoví se s 2,0 g. Použije se 15,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS*, před provedením titrace se zředí 50 ml *lihu 96% R*.

Redukující látky. 2,00 g se rozpustí ve 25 ml horké *vody R*, přidá se 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *feroinu RS*. Titruje se *hexanitratoceričitanem amonným 0,01 mol/l VS* za stálého protřepávání do změny červeného zbarvení na zelenomodré, které je stálé 30 s. Provede se slepá zkouška. Spotřebují se nejvýše 2,0 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,01 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

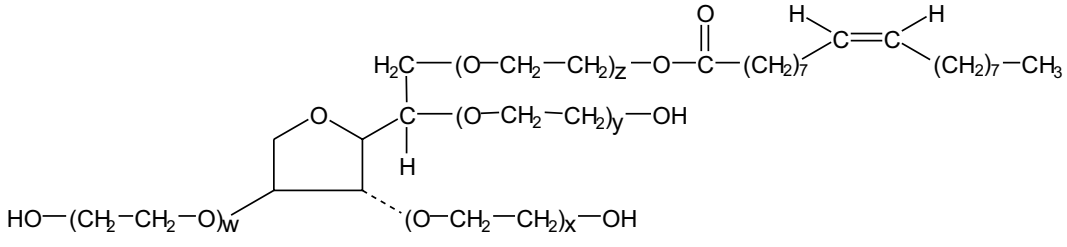
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %. Ke 2,00 g v křemenném nebo platinovém kelímku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 2 h na vodní lázni. Opatrně se žíhá při nízké teplotě do úplného zuhelnatění. K zuhelnatělé hmotě se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R*, opatrně se zahřívá, dokud se uvolňují bílé dýmy, a žíhá se při teplotě 600 °C do vymizení všech černých částí. Nechá se vychladnout, zváží se a žíhání se opakuje vždy po 15 min do konstantní hmotnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Polysorbatum 80

Polysorbát 80



CAS 9005-65-6

w + x + y + z = 20

Je to směs parciálních esterů kyseliny olejové a sorbitolu a jejich anhydridů kopolymerizovaných přibližně s 20 moly ethylenoxidu na každý mol sorbitolu a sorbitolanhydridu.

Vlastnosti

Olejovitá nažloutlá nebo nahnědle žlutá čirá kapalina. Je mísitelný s vodou, s ethanolem, s ethylacetatem a s methanolem, prakticky nerozpustný v mastných olejích a v tekutém parafinu.

Relativní hustota je asi 1,08. Jeho viskozita při 25 °C je asi 400 mPa.s.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí při asi 50 °C ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Při třepání roztok silně pění. Přidá se 0,5 g *chloridu sodného R* a zahřeje se k varu. Vzniklý zákal zmizí během ochlazení na asi 50 °C.

B. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Po ochlazení na asi 80 °C se přidá 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zahřívá se asi 10 min pod zpětným chladičem do odstranění emulze. Ochladí se na 50 °C a odstřeďuje se. Mastná kyselina se oddělí na povrchu jako olejovitá kapalina. Po ochlazení na pokojovou teplotu se mastná kyselina přenese bez protřepání do dělicí nálevky za použití 50 ml *etheru petrolejového R*. Organická vrstva se promyje třikrát 5 ml *vody R*. Organická vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni. Získaný zbytek se přenese do směsi 2 ml *kyseliny dusičné R* a 3 ml *vody R* a opatrně se po malých částech přidá 0,5 g *dusitanu sodného R* a nechá se stát při pokojové teplotě; vrstva mastné kyseliny během 4 h ztuhne.

C. Ke 2 ml roztoku (50 g/l) se přidá 0,5 ml *bromové vody R;* roztok se odbarví.

D. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *chloroformu R*. Přidá se 0,1 g *thiokyanatanu draselného R* a 0,1 g *dusičnanu kobaltnatého R* a míchá se skleněnou tyčinkou; roztok zmodrá.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 2,0; stanoví se s 5,0 g rozpuštěnými v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 65 až 80; stanoví se s 2,0 g (Metoda A).

Číslo jodové (*2.5.4*). 18 až 24.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 45 až 55; stanoví se s 2,0 g. Použije se 15,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS*, před provedením titrace se zředí 50 ml *lihu 96% R*.

Redukující látky. 2,00 g se rozpustí ve 25 ml horké *vody R*, přidá se 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 0,1 ml *ferroinu RS*. Titruje se *hexanitratoceričitanem amonným 0,01 mol/l VS* za stálého protřepávání do změny červeného zbarvení na zelenomodré, které je stálé 30 s. Provede se slepá zkouška. Spotřebuje se nejvýše 5,0 ml *hexanitratoceričitanu amonného 0,01 mol/l VS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %. Ke 2,00 g v křemenném nebo platinovém kelímku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 2 h na vodní lázni. Opatrně se žíhá při nízké teplotě do úplného zuhelnatění. K zuhelnatělé hmotě se přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R*, opatrně se zahřívá, dokud se uvolňují bílé dýmy, a žíhá se při teplotě 600 °C do vymizení všech černých částí. Nechá se vychladnout, zváží se a žíhání se opakuje vždy po 15 min do konstantní hmotnosti.

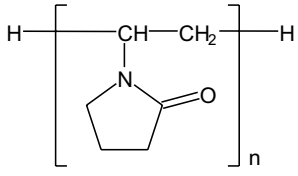
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Povidonum

Povidon

Synonymum. Polyvidonum



$(C_6H_9NO)_n$ M_r $(111,1)_n$ CAS 9003-39-8

Je to poly[1-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)ethylen] sestávající z lineárních polymerů 1-vinyl-2-pyrrolidonu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 11,5 % až 12,8 % dusíku. Různé druhy povidonu jsou charakterizovány viskozitou jejich roztoků vyjádřenou K-hodnotou. U povidonu, který má udanou K-hodnotu 15 nebo nižší, je nalezená K-hodnota 85,0 % až 115,0 % deklarované hodnoty. U povidonu, který má udanou K-hodnotu nebo průměr udaného rozmezí K-hodnoty vyšší než 15, je nalezená K-hodnota 90,0 % až 108,0 % deklarované hodnoty.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý prášek nebo vločky. Je hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v methanolu, těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *povidonu CRL*. Zaznamenají se spektra za použití 4 mg látek předem sušených 6 h při 105 °C.

B. K 0,4 ml roztoku S1, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 10 ml *vody R*, 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 2 ml *dichromanu draselného RS;* vznikne oranžově žlutá sraženina.

C. K 1 ml roztoku S1 se přidá 0,2 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS1* a 0,1 ml *kyseliny sírové R;* vznikne růžové zbarvení.

D. K 0,1 ml roztoku S1 se přidá 5 ml *vody R* a 0,2 ml *jodu 0,05 mol/l RS;* vznikne červené zbarvení.

E. Je snadno rozpustný ve *vodě R*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml. Zkoušená látka se přidává do vody po malých dávkách za stálého míchání magnetickou míchačkou.

Roztok S1. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml. Zkoušená látka se přidává do vody po malých dávkách za stálého míchání magnetickou míchačkou.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6, $Č_6$ nebo $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,0 až 5,0 pro látku s K-hodnotou nejvýše 30; 4,0 až 7,0 pro látku s K-hodnotou větší než 30. Měří se roztok S.

Aldehydy. Nejvýše 500 μg/g, vyjádřeno jako acetaldehyd.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 9,0* a zředí se jím na 100,0 ml. Baňka se uzavře a zahřívá se 1 h při 60 °C. Nechá se ochladit.
Porovnávací roztok. 0,100 g čerstvě předestilovaného *acetaldehydu R* se rozpustí ve *vodě R* při 4 °C a zředí se stejným rozpouštědlem na 200,0 ml. Nechá se 20 h stát při 4 °C. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 9,0* na 100,0 ml.

Do tří stejných spektrofotomerických kyvet s 10mm vrstvou se vpraví odděleně 0,5 ml zkoušeného roztoku, 0,5 ml porovnávacího roztoku a 0,5 ml *vody R* (slepá zkouška). Do každé kyvety se přidá 2,5 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 9,0* a 0,2 ml *nikotinamid-adenin dinukleotidu RS*, promíchá se, přiklopí se víčka a kyvety se nechají stát 2 min až 3 min při (22 ± 2) °C. Měří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 340 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny. Do každé kyvety se přidá 0,05 ml *aldehyddehydrogenasy RS*, promíchá se, přiklopí se víčka a kyvety se nechají stát 5 min při (22 ± 2) °C. Měří se absorbance každého roztoku při 340 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny. Vypočítá se obsah aldehydů podle vzorce:

$$\frac{(A_{t2} - A_{t1}) - (A_{b2} - A_{b1})}{(A_{s2} - A_{s1}) - (A_{b2} - A_{b1})} \cdot \frac{100\ 000\ .\ C}{m},$$

v němž značí:
A_{t1} - absorbanci zkoušeného roztoku před přidáním aldehyddehydrogenasy,
A_{t2} - absorbanci zkoušeného roztoku po přidání aldehyddehydrogenasy,
A_{s1} - absorbanci porovnávacího roztoku před přidáním aldehyddehydrogenasy,
A_{s2} - absorbanci porovnávacího roztoku po přidání aldehyddehydrogenasy,
A_{b1} - absorbanci kontrolního roztoku před přidáním aldehyddehydrogenasy,
A_{b2} - absorbanci kontrolního roztoku po přidání aldehyddehydrogenasy,
m - navážku zkoušené látky v gramech, počítáno na vysušenou látku,
C - koncentraci acetaldehydu v porovnávacím roztoku v mg/ml.

Peroxidy. 2,0 g se rozpustí v 50 ml *vody R*. K 25 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml *zkoumadla chlorid titanitý-kyselina sírová R* a nechá se 30 min stát. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 405 nm za použití směsi 25 ml roztoku zkoušené látky (40 g/l) a 2 ml 13% *(V/V)* roztoku *kyseliny sírové R* jako kontrolní kapaliny. Absorbance není větší než 0,35 (400 μg/g, vyjádřeno jako H_2O_2).

Hydrazin. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R. Použijí se čerstvě připravené roztoky.*

Zkoušený roztok. 2,5 g se rozpustí v 25 ml *vody R*, přidá se 0,5 ml roztoku *salicylaldehydu R* (50 g/l) v *methanolu R*, promíchá se a zahřívá se 15 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se přidají 2,0 ml *toluenu R*, 2 min se protřepává a odstřeďuje se. Použije se supernatantní tekutina.
Porovnávací roztok. 9 mg *salicylaldazinu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *toluenem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1 + 2) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pozoruje se v ultrafialo-

vém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající salicylaldazinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1 μg/g hydrazinu).

Vinylpyrrolidon. Nejvýše 10 μg/g. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *1-vinyl-2-pyrrolidon R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. 5,0 ml se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *1-vinyl-2-pyrrolidonu R* a 0,5 g *vinylacetatu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm a předkolony délky 0,025 m a vnitřního průměru 4,0 mm, obě naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (1 + 4),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (a) a nastaví se průtoková rychlost tak, aby retenční čas píku odpovídajícího 1-vinyl-2-pyrrolidonu činil asi 10 min. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píku odpovídajícího 1-vinyl-2-pyrrolidonu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 70 % rozsahu zapisovače. Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem 1-vinyl-2-pyrrolidonu a píkem vinylacetatu je nejméně 2,0. Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (a) pětkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku 1-vinyl-2-pyrrolidonu je nejvýše 2,0 %.

Nastříkne se 50 μl zkoušeného roztoku. Po každém nástřiku zkoušeného roztoku se promývá předkolona mobilní fází stejnou zvolenou rychlostí pro zkoušku po dobu 30 min.

Vypočítá se obsah 1-vinyl-2-pyrrolidonu z ploch píků.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Viskozita, vyjádřená jako K-hodnota. Pro látku s deklarovanou K-hodnotou: 18 nebo méně se použije roztok 50 g/l; více než 18 se použije roztok 10 g/l; více než 95 se použije roztok 1,0 g/l.

Roztok se nechá 1 h stát a stanoví se viskozita *(2.2.9)* při (25 ± 0,1) °C za použití viskozimetru č. 1 s minimální dobou průtoku 100 s.

K-hodnota se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{1{,}5\log\eta - 1}{0{,}15 + 0{,}003c} + \frac{\sqrt{300c\log\eta + (c + 1{,}5c\log\eta)^2}}{0{,}15c + 0{,}003c^2},$$

v němž značí:
c - obsah zkoušené látky v g/100 ml, počítáno na vysušenou látku,
η - relativní viskozitu roztoku k *vodě R*.

Stanovení obsahu

100,0 mg (m mg) se převede do spalovací baňky, přidá se 5 g směsi 33 g *síranu draselného R*, 1 g *síranu měďnatého R* a 1 g *oxidu titaničitého R* a tři skleněné varné kuličky. Zachycené částečky

látky v hrdle baňky se spláchnou do baňky malým množstvím *vody R*, přidá se 7 ml *kyseliny sírové R* a obsah baňky se promíchá kroužením baňky. Baňka se uzavře např. skleněnou nálevkou s krátkou stopkou k zamezení ztrátám kyseliny sírové. Zahřívá se za postupného zvyšování teploty až do silného varu, při němž kondenzuje kyselina sírová v hrdle baňky a předchází se přehřátí horní části baňky. Pokračuje se v zahřívání ještě 45 min. Po ochlazení se pevné části rozpustí opatrným přidáním 20 ml *vody R* a po ochlazení se umístí baňka do přístroje na destilaci s vodní parou, přidá se 30 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného R*, nálevka se opláchne 10 ml *vody R* a ihned se destiluje s vodní parou. Jímá se asi 80 ml až 100 ml destilátu do 30 ml roztoku *kyseliny borité R* (40 g/l) s třemi kapkami směsného indikátoru (0,15 g *zeleně bromkresolové R* a 0,1 g *červeně methylové R* se rozpustí ve 180 ml *ethanolu R* a zředí se *vodou R* na 200 ml) a nakonec se opláchne malým množstvím *vody R* konec chladiče, který je při destilaci ponořen pod hladinou kyseliny borité. Destilát se titruje *kyselinou sírovou 0,025 mol/l VS*, až se zelené zbarvení roztoku změní na slabě šedavě modré až šedavě fialově červené (n_1 ml *kyseliny sírové 0,025 mol/l VS*).

Zkouška se opakuje za použití 100 mg *glukosy R* místo zkoušené látky (n_2 ml *kyseliny sírové 0,025 mol/l VS*).

Obsah dusíku v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{0{,}7004\ (n_1 - n_2)}{m} \cdot 100 \ .$$

Uchovávání

Chráněn před vlhkostí.

Označování

V označení na obalu se uvede K-hodnota.

Povidonum iodinatum

Jodovaný povidon

Synonymum. Polyvidonum iodinatum

Je to komplex jodu a povidonu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 9,0 % až 12,0 % uvolnitelného jodu.

Výroba

Vyrábí se za použití povidonu, který vyhovuje článku Povidonum.

Vlastnosti

Žlutohnědý až červenohnědý amorfní prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem jodovaného povidonu Ph. Eur*.

B. 10 mg se rozpustí v 10 ml *vody R* a přidá se 1 ml *škrobu RS;* vznikne tmavě modré zbarvení.

C. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody R* a po kapkách se přidává roztok *siřičitanu sodného R* (10 g/l) do odbarvení roztoku. Potom se přidájí 2 ml *dichromanu draselného RS* a 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R;* vznikne světle hnědá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 1,5 až 5,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Jodidy. Nejvýše 6,0 %; počítáno na vysušenou látku. 0,500 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a přidává se *disiřičitan sodný R* do odbarvení jodu. Přidá se 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 10 ml *kyseliny dusičné R* a 5 ml *síranu amonno-železitého RS2* a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,69 mg celkového jodu. Z procentuálního obsahu celkového jodu, počítaného na vysušenou látku, se odečte obsah uvolnitelného jodu v procentech zjištěný ve zkoušce Stanovení obsahu.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 8,0 %; 0,500 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C po dobu 3 h.

Síranový popel *(2.2.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

1,00 g se v baňce se zabroušenou zátkou míchá 1 h se 150 ml *vody R*. Přidá se 0,1 ml *kyseliny octové zředěné RS* a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru.

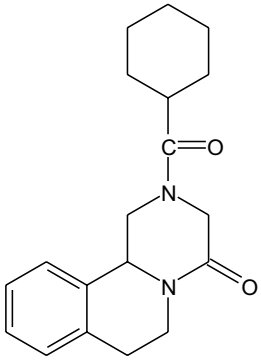
1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,69 mg volného jodu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Praziquantelum

Prazikvantel



$C_{19}H_{24}N_2O_2$ M_r 312,41 CAS 55268-74-1

Je to (*RS*)-2-cyklohexylkarbonyl-1,2,3,6,7,11*b*-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isochinolin-4-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{19}H_{24}N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 136 °C až 140 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *prazikvantelu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *prazikvantelu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *prazikvantelu nečistoty A CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 2 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Po vysušení na vzduchu se vrstva vystaví na 20 min působení par jodu a potom se hodnotí v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *prazikvantelu nečistoty A CRL* a 10 mg *prazikvantelu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (45 + 55), s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška dvou hlavních píků nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky prazikvantelu nečistoty A a prazikvantelu je nejméně 3,0.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková plocha píku je větší než 0,4násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 2 h suší v sušárně při 50 °C nad *oxidem fosforečným R* a tlaku nepřevyšujícím 700 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

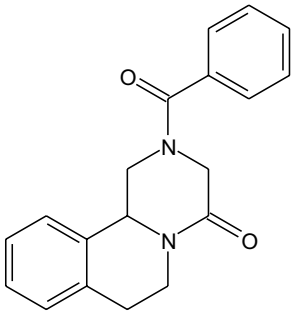
40,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 40,0 mg *prazikvantelu CRL*. Měří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 265 nm.

Vypočítá se obsah $C_{19}H_{24}N_2O_2$ z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

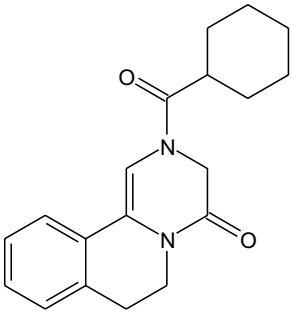
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

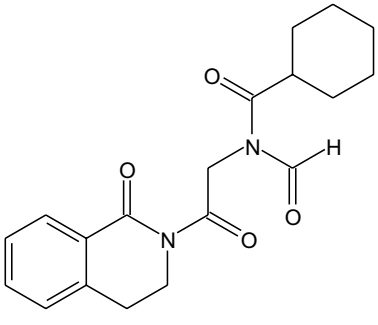
Nečistoty



A. (*RS*)-2-benzoyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isochinolin-4-on,



B. 2-cyklohexylkarbonyl-2,3,6,7-tetrahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isochinolin-4-on,



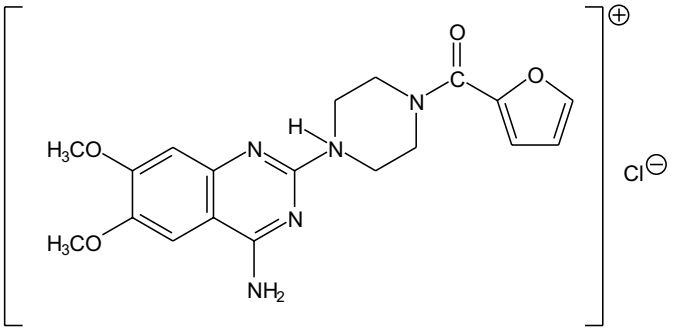
C. 2-[2-(N-formylcyklohexylkarbonylamino)acetyl]-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-on.

† Prazosini hydrochloridum

1998

Prazosiniumchlorid

Synonymum. Prazosinium chloratum



$C_{19}H_{22}ClN_5O_4$ $_r$ 419,87 CAS 19237-84-4

Je to 1-(4-amino-6,7-dimethoxy-2-chinazolinyl)-4-(2-furoyl)piperaziniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{19}H_{22}ClN_5O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu, prakticky nerozpustný v acetonu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,1% (*V/V*) v *methanolu R* a zředí se stejným roztokem na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí na 100,0 ml (roztok A) a 5,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* 0,1% (*V/V*) v *methanolu R* na 100,0 ml (roztok B). Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku A při 220 nm až 280 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 247 nm. Specifická absorbance v maximu při 247 nm je 1320 až 1400. Měří se absorbance roztoku B při 280 nm až 400 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 330 nm a 343 nm. Specifická absorbance v maximu při 330 nm je 260 až 280 a v maximu při 343 nm je 240 až 265.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prazosiniumchloridu CRL*. Měří se tablety látek s *chloridem draselným R.* Pokud jsou změřená spektra rozdílná, rozpustí se odděleně 50 mg zkoušené látky a 50 mg *prazosiniumchloridu CRL* ve směsi 10 ml *vody R* a 10 ml *lihu 96% R*, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a roztok se protřepe dvakrát s 25 ml *dichlormethanu R.* Organické vrstvy se spojí, odpaří se a zbytek se suší při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 700 Pa. Se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 2 mg se rozpustí ve 2 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*. Roztoky se připraví v rozpouštědlové směsi, kterou je směs objemových dílů *diethylaminu R*, *dichlormethanu R* a *methanolu R* (1 + 10 + 10).

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v rozpouštědlové směsi a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí rozpouštědlovou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *prazosiniumchloridu CRL* se rozpustí v rozpouštědlové směsi a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí rozpouštědlovou směsí na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *ethylacetatu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Železo. Nejvýše 100 µg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. K 1,0 g se přidá po kapkách asi 1,5 ml *kyseliny dusičné R*. Po odkouření se zahřívá na vodní lázni, pak se žíhá za postupně se zvyšující teploty od 150 °C do 1000 °C a při nejvyšší teplotě se žíhá po dobu 1 h. Po ochlazení se zbytek po žíhání rozpustí ve 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, odpaří se na asi 5 ml a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku železa (8 µg Fe/ml)* zředěním dle potřeby *vodou R*.

Měří se absorbance při 248 nm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Nikl. Nejvýše 50 µg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se zkoušený roztok připravený pro stanovení železa.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku niklu (10 µg Ni/ml)* zředěním dle potřeby *vodou R*.

Měří se absorbance při 232 nm za použití niklové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije směs stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Z důvodu předejití přehřátí reakčního prostředí se po celou dobu stanovení důkladně míchá a titrace se zastaví okamžitě po dosažení bodu ekvivalence.

0,350 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a 30 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

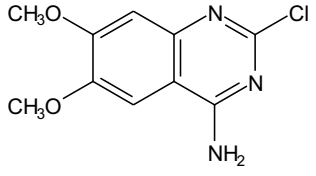
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,99 mg $C_{19}H_{22}ClN_5O_4$.

Uchovávání

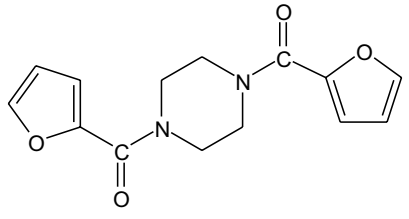
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

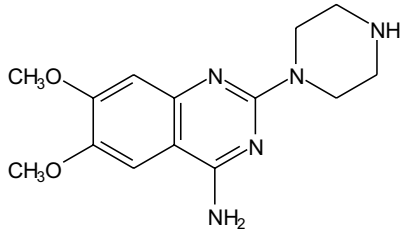
Nečistoty



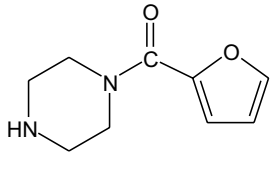
A. 2-chlor-6,7-dimethoxychinazolin-4-amin,



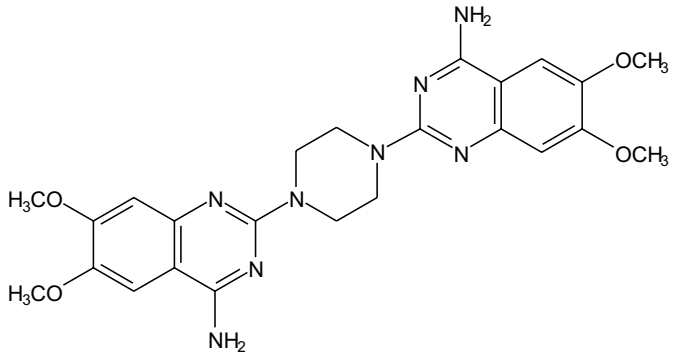
B. (1,4-piperazindiyl)bis(2-furylketon),



C. 6,7-dimethoxy-2-(1-piperazinyl)chinazolin-4-amin,



D. 2-furyl-1-piperazinylketon,

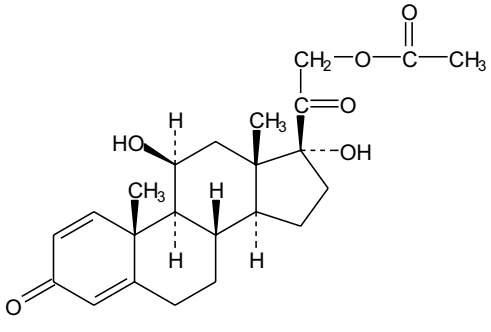


E. 2,2′-(1,4-piperazindiyl)bis(6,7-dimethoxychinazolin-4-amin).

† Prednisoloni acetas

Prednisolonacetat

1998



$C_{23}H_{30}O_6$ M_r 402,49 CAS 52-21-1

Je to 11β,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-acetat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{23}H_{30}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Taje při asi 230 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *prednisolonacetatu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *prednisolonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *prednisolonpivalatu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zábrusové zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 2 h 30 min při 45 °C za ochrany před světlem a pak se nechá se vychladnout.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *prednisolonacetatu CRL* se rozpustí mírným zahřátím v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převedou do 15ml skleněné zábrusové zkumavky se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Přidá se 10 ml *hydrogenuhličitanu draselného nasyceného v methanolu RS* a ihned se probublává intenzivním proudem *dusíku R* po dobu 5 min. Zkumavka se uzavře a zahřívá se ve vodní lázni 2 h 30 min při 45 °C za ochrany před světlem a nechá se vychladnout.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušených roztoků odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů

zkoušených roztoků se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červené zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok červenohnědě fluoreskuje. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok zelenožlutě fluoreskuje.

E. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na acetyl (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +112° až +119°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *hydrokortisonacetatu CRL* a 2 mg *prednisoloncetatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným deaktivovaným pro chromatografii bazických látek R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která se připraví takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 350 ml *acetonitrilu R* a 600 ml *vody R* a nechá se ustát. Potom se doplní *vodou R* na 1000 ml a opět se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtokové rychlosti mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu s 20 μl porovnávacího roztoku (b) činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: prednisolonacetatu asi 24 min a hydrokortisonacetatu asi 26 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími prednisolonacetatu a hydrokortisonacetatu je nejméně 2,5. V případě potřeby se upraví koncentrace *acetonitrilu R* v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1 %) a nejvýše jedna taková plocha píku je větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 2násobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 243 nm.

Vypočítá se obsah $C_{23}H_{30}O_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 370.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

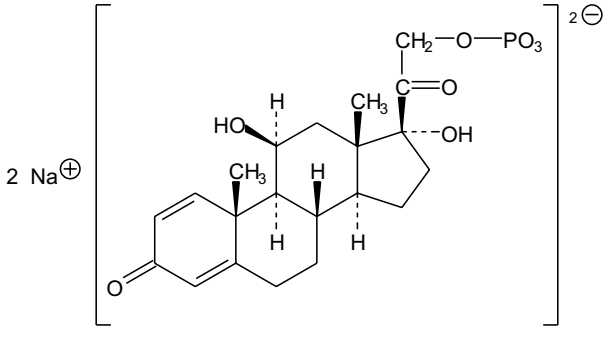
Nečistoty

A. hydrokortisonacetat,
B. prednisolon.

† Prednisoloni natrii phosphas

1998

Sodná sůl prednisolonfosfatu



$C_{21}H_{27}Na_2O_8P$ M_r 484,39 CAS 125-02-0

Je to disodná sůl 11β,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-fosfatu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{21}H_{27}Na_2O_8P$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *ethanolem R* na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zábrusové skleněné zkumavky s uzávěrem, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině*

sírové RS, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 415 nm je 0,10 až 0,20.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli prednisolonfosfatu CRL*. Pokud spektra získaná v pevném stavu vykazují rozdíly, odděleně se zkoušená látka a referenční látka rozpustí v co nejmenším objemu *lihu 96% R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra obou látek.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *sodné soli prednisolonfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *sodné soli dexamethasonfosfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové RS, vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě skvrny, které nemusí být zcela odděleny.

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červené zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok vykazuje červenohnědou fluorescenci. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a v ultrafialovém světle při 365 nm roztok zelenožlutě fluoreskuje.

E. K asi 40 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a směs se opatrně zahřívá až do vzniku bílého dýmu, pak se za současného zahřívání přidává po kapkách *kyselina dusičná R*, až je výsledný roztok téměř bezbarvý, a ochladí se. Přidají se 2 ml *vody R* a opakuje se zahřívání až do vzniku bílého dýmu. Po ochlazení se přidá 10 ml *vody R* a roztok se neutralizuje *amoniakem zředěným RS1* na *papír lakmusový červený R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na sodík *(2.3.1)* a zkoušce (b) na fosforečnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zabarven než porovnávací barevný roztok H_7 *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,5 až 9,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +94° až +100°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli prednisolonfosfatu CRL* a 25 mg *prednisolonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí připravenou takto: do 250ml kuželové baňky se naváží 1,360 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 0,600 g *hexylaminu R*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Potom se směs rozpustí v 185 ml *vody R*, přidá se 65 ml *acetonitrilu R*, promíchá se a zfiltruje se filtrem s velikostí pórů 0,45 μm.
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) činila 70 % až 90 % stupnice zapisovače. Při průtoku mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při záznamu chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: sodné soli prednisolonfosfatu asi 6,5 min, prednisolonu asi 8,5 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími sodné soli prednisolonfosfatu a prednisolonu je nejméně 4,5. V případě potřeby se zvýší koncentrace *acetonitrilu R* nebo *vody R* v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %) a nejvýše jeden takový pík má plochu větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Anorganické fosforečnany. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R*, promíchá se a nechá se 5 min stát. Žluté zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml základního *roztoku fosforečnanů (5 g PO_4/ml)* (1 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 247 nm.

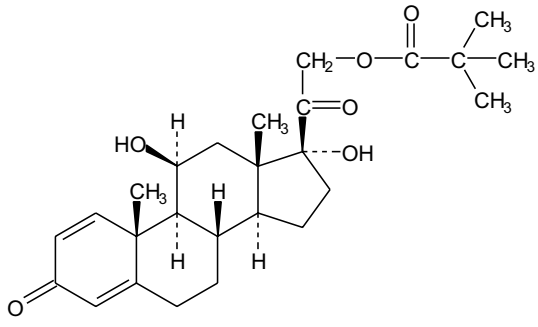
Vypočítá se obsah $C_{21}H_{27}Na_2O_8P$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 312.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Prednisoloni pivalas

Prednisolonpivalat



$C_{26}H_{36}O_6$ M_r 444,57 CAS 1107-99-9

Je to 11 ,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-(2,2-dimethylpropionat). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{26}H_{36}O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v dichlormethanu.

Taje při asi 229 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se odměří do zábrusové skleněné zkumavky s uzávěrem, přidá se 10,0 ml *fenylhydrazinu v kyselině sírové RS*, promíchá se a zahřívá se 20 min ve vodní lázni při 60 °C a pak se ihned ochladí. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená při 415 nm je 0,20 až 0,30.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prednisolonpivalatu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *lihu 96% R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *prednisolonpivalatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *prednisolonacetatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou smícháním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) a směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červené zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok červenohnědě fluoreskuje. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí a při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok zelenožlutě fluoreskuje.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +104° až +112°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí ve 2 ml směsi objemových dílů *vody R* a *tetrahydrofuranu R* (1 + 4) a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *prednisolonacetatu CRL,* 25 mg *kortisonacetatu CRL* a 25,0 mg *prednisolonpivalatu CRL* se rozpustí ve 2 ml směsi objemových dílů *vody R* a *tetrahydrofuranu R* (1 + 4) a zředí se mobilní fází na 25,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která se připraví takto: 19 ml *butylacetatu R1* se opatrně smíchá s 37 ml *tetrahydrofuranu R* a 213 ml *methoxyethanolu R* a potom s 231 ml *vody R,* nechá se 1 h ustát a zfiltruje se (0,45 μm),
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Citlivost se nastaví tak, aby hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) činil 70 % až 90 % celé stupnice zapisovače.

Při průtokové rychlosti mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 30 min.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: prednisolonacetatu asi 3,5 min, kortisonacetatu asi 4,5 min a prednisolonpivalatu asi 13 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími prednisolonacetatu a kortisoncetatu je nejméně 2,5. V případě potřeby se upraví koncentrace *vody R* v mobilní fázi.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %) a nejvýše jedna taková plocha píku je větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,25násobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 250,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 243 nm.

Vypočítá se obsah $C_{26}H_{36}O_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 337.

Uchovávání

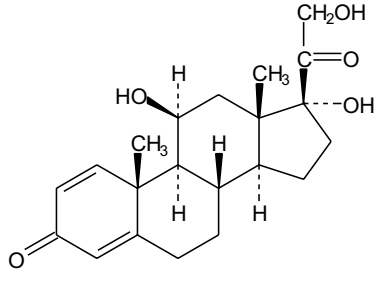
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

---

† Prednisolonum

Prednisolon



$C_{21}H_{28}O_5$ M_r 360,45 CAS 50-24-8

Je to 11β,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{21}H_{28}O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a v methanolu, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prednisolonu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *acetonu R*, odpaří se na vodní lázni do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *prednisolonu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *hydrokortisonu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) smíchaná se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Provede se druhé vyvíjení ve směsi objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převede do skleněné zábrusové zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se pod proudem *dusíku R* odpaří za opatrného zahřátí. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*) a 50 mg *bismutičnanu sodného R.* Zkumavka se uzavře a suspenze se mechanicky třepe 1 h za ochrany před světlem. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*), směs se filtruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R*. Čirý filtrát se třepe s 10 ml *dichlormethanu R.* Organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R* .
Porovnávací roztok (a). 25 mg *prednisolonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převede do skleněné zábrusové zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se pod proudem dusíku odpaří za opatrného zahřátí. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*) a 50 mg *bismutičnanu sodného R.* Zkumavka se uzavře a suspenze se mechanicky třepe 1 h za ochrany před světlem. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*), směs se filtruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R.* Čirý filtrát se třepe s 10 ml *dichlormethanu R.* Organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R.*

Na vrstvu se odděleně nanese 5 μl zkoušeného roztoku (a), 5 μl porovnávacího roztoku (a), 10 μl zkoušeného roztoku (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (b) nanesených ve dvou malých dávkách, aby se získaly malé skvrny. Vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) smíchaná se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Provede se druhé vyvíjení ve směsi objemových dílů *1-butanolu R* nasyceného *vodou R*, *toluenu R* a *etheru R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušných porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 15 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně vyšší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného rozto-ku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne intenzivní červené zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok červenohnědě fluoreskuje. Po 5 min se k roztoku přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí, vzniká žlutá fluorescence v ultrafialovém světle při 365 nm a šedá vločkovitá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +96° až +102°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *prednisolonu CRL* a 2 mg *hydrokortisonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která se připraví takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 50 ml *methanolu R*, 3,5 ml *vody R* a 700 ml *chloroformu stabilizovaného amylenenem R* a nechá se ustát. Potom se doplní *chloroformem stabilizovaným amylenem R* na 1000,0 ml a opět se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtokové rychlosti mobilní fáze 1 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 45 min.

Citlivost systému se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu s 20 μl porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: hydrokortisonu asi 12 min a prednisolonu asi 15 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími hydrokortisonu a prednisolonu je nejméně 5,0. V případě potřeby se upraví koncentrace *methanolu R* a *vody R* v mobilní fázi za dodržení poměru methanolu a vody a homogenity mobilní fáze.

Nastříkne se odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 3,5násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jedna taková plocha píku je větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,025násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 243,5 nm.

Vypočítá se obsah $C_{21}H_{28}O_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 415.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

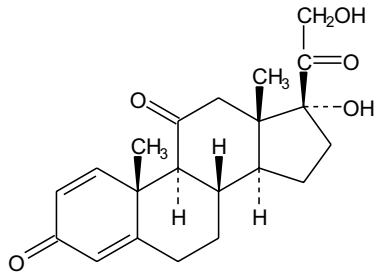
Separandum.

Nečistoty

A. hydrokortison.

† Prednisonum

Prednison



$C_{21}H_{26}O_5$ M_r 358,43 CAS 53-03-2

Je to 17,21-dihydroxy-1,4-pregnadien-3,11,20-trion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{21}H_{26}O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prednisonu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v co nejmenším množství *acetonu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se znovu zaznamenají spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *prednisonu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *betamethasonu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) smíchaná se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77), po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 10 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho,

až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě zkoušeného roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě zkoušeného roztoku (a) se převede do skleněné zábrusové zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se pod proudem dusíku odpaří za opatrného zahřátí. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*) a 50 mg *bismutičnanu sodného R.* Zkumavka se uzavře a suspenze se mechanicky třepe 1 h za ochrany před světlem. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*), směs se filtruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R.* Čirý filtrát se třepe s 10 ml *dichlormethanu R.* Organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R.*

Porovnávací roztok (a). 25 mg *prednisonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml. Tento roztok se rovněž použije k přípravě porovnávacího roztoku (b). 2 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 0,4 ml roztoku získaného při přípravě porovnávacího roztoku (a) se převede do skleněné zábrusové zkumavky 100 mm dlouhé a o průměru 20 mm se skleněnou nebo polytetrafluorethylenovou zátkou. Rozpouštědlo se pod proudem dusíku odpaří za opatrného zahřátí. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*) a 50 mg *bismutičnanu sodného R.* Zkumavka se uzavře a suspenze se mechanicky třepe 1 h za ochrany před světlem. Přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* 15% (*V/V*), směs se filtruje do 50ml dělicí nálevky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *vody R.* Čirý filtrát se třepe s 10 ml *dichlormethanu R.* Organická vrstva se promyje 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, dvakrát 5 ml *vody R* a vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R.*

Na vrstvu se odděleně nanese 5 μl zkoušeného roztoku (a), 5 μl porovnávacího roztoku (a), 50 μl zkoušeného roztoku (b) a 50 μl porovnávacího roztoku (b) nanesených ve dvou malých dávkách, aby byly získány malé skvrny. Vyvíjí se mobilní fází, kterou je směs objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) smíchaná se směsí objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77), po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu příslušných porovnávacích roztoků. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a 15 min se zahřívá při 120 °C nebo tak dlouho, až se objeví skvrny. Po vychladnutí se vrstva pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na každém z chromatogramů zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) má hodnotu R_F zřetelně vyšší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 2 mg se přidají 2 ml *kyseliny sírové R* a třepe se do rozpuštění; během 5 min vznikne žluté zbarvení. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm roztok modře fluoreskuje. K roztoku se přidá 10 ml *vody R* a promíchá se; zbarvení zmizí, ale fluorescence v ultrafialovém světle zůstává.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +167° až +175°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,125 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *prednisonu CRL* a 2 mg *prednisolonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony 0,25 m dlouhé a o vnitřním průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2,5 ml/min s lineárním gradientovým programem za použití následujících podmínek:
  - *mobilní fáze A* - v odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 100 ml *acetonitrilu R* s 200 ml *methanolu R* a se 650 ml *vody R*, nechá se ustálit, doplní se *vodou R* na 1000 ml a opět se promíchá,
  - *mobilní fáze B - acetonitril R*,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0	100	0	izokraticky
25	100	0	počátek lineárního gradientu
40	40	60	konec chromatogramu, návrat na 100B
41	0	100	počátek ustalování s B
46	0	100	konec ustalování, návrat na 100A
47	100	0	začátek ustalování s A
52 = 0	100	0	konec ustalování, začátek dalšího chromatogramu

- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Teplota kolony se udržuje při 45 °C. Kolona se ustaluje s mobilní fází B při průtokové rychlosti 2,5 ml/min po dobu nejméně 30 min a potom s mobilní fází A po dobu 5 min. Pro následující chromatogramy se použijí podmínky popsané mezi 40. min až 52. min.

Nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu při nastříknutí 20 μl porovnávacího roztoku (b) činila nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a při zaznamenání chromatogramu za výše popsaných podmínek retenční časy látek jsou: prednisonu asi 19 min a prednisolonu asi 23 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky prednisonu a prednisolonu není menší než 2,7. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi A.

Nastříkne se odděleně po 20 μl *methanolu R* jako slepá zkouška, 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než 0,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovná-

vacího roztoku (b) (0,25 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 0,75násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,75 %). K píkům zjištěným na chromatogramu při slepé zkoušce a píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b), se nepřihlíží.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 C až 105 C.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238 nm.

Vypočítá se obsah $C_{21}H_{26}O_5$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 425.

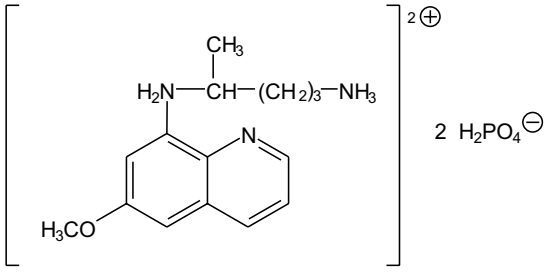
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Primaquini diphosphas

Primachininiumdifosfat



$C_{15}H_{27}N_3O_9P_2$ M_r 455,34 CAS 63-45-6

Je to (*RS*)-N-4-(6-methoxy-8-chinolyl)-1,4-pentadiamonium-bis(dihydrogenfosfat). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{15}H_{27}N_3O_9P_2$.

Vlastnosti

Oranžový krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Taje při asi 200 C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 15 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 310 nm až 450 nm. Absorpční maxima jsou při 332 nm

a 415 nm. Specifické absorbance v maximech jsou 45 až 52 a 27 až 35. 5,0 ml roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml. Tento roztok měřený při 215 nm až 310 nm vykazuje tři absorpční maxima, při 225 nm, 265 nm a 282 nm. Specifické absorbance v maximech jsou 495 až 515, 335 až 350 a 330 až 345.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *primachininiumdifosfatu CRL*. Látky se zkouší ve formě tablet připravených takto: 0,1 g zkoušené látky se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidají se 2 ml *amoniaku zředěného RS2*, 5 ml *chloroformu R* a protřepe se. Chloroformová vrstva se vysuší nad 0,5 g *síranu sodného bezvodého R*. Připraví se tableta z 0,3 g *bromidu draselného R* a na ní se po kapkách nanese 0,1 ml chloroformové vrstvy, přičemž se chloroform nechá vždy odpařit. Pak se tableta suší 2 min při 50 °C. Stejně se postupuje s referenční látkou.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm. *Všechny postupy je třeba provádět co nejrychleji a za ochrany před světlem. Zkoušený roztok a porovnávací roztok se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* na 10 ml.
Porovnávací roztok. 20 mg *primachininiumdifosfatu CRL* se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Vrstva se promyje směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 40 + 60) a nechá se vysušit na vzduchu. Pak se na ni nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se uvedenou směsí rozpouštědel použitou při promytí vrstvy po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidají se 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a protřepe se dvakrát 5 ml *chloroformu R;* vodná vrstva okyselená *kyselinou dusičnou R* vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se s 10,0 ml mobilní fáze. Použije se čirá spodní vrstva.
Porovnávací roztok (a). 50 mg *primachininiumdifosfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se s 10,0 ml mobilní fáze. Použije se čirá spodní vrstva.
Porovnávací roztok (b). 3,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,2 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *chloroformu R* a *hexanu R* (0,1 + 10 + 45 + 45), s průtokovou rychlostí 3,0 ml/min,

- spektrofotometrického detektoru, 261 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně vždy 20 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající nejméně dvojnásobku retenčního času primachininu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3,0 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla a k píkům s plochou menší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je těsně před hlavním píkem pík s plochou asi 6 % plochy hlavního píku a rozlišení mezi těmito píky je nejméně 2,0. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je poměr signálu hlavního píku k šumu nejméně 5.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,2000 g se rozpustí mírným zahřátím ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Po ochlazení se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 22,77 mg $C_{15}H_{27}N_3O_9P_2$.

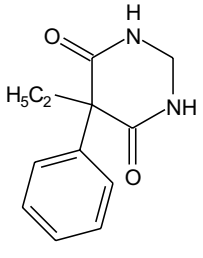
Uchovávání

Chráněn před světlem.

Separandum.

† Primidonum

Primidon



$C_{12}H_{14}N_2O_2$ M_r 218,25 CAS 125-33-7

Je to 5-ethyl-5-fenyl-2,3-dihydro-4,6(1*H*,5*H*)-pyrimidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{12}H_{14}N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Použije se roztok předepsaný pro stanovení obsahu. Měří se absorbance tohoto roztoku při 240 nm až 300 nm *(2.2.25)*. Absorpční maxima roztoku jsou při 252 nm, 257 nm a 264 nm a absorpční minima jsou při 254 nm a 261 nm. Poměr absorbance v maximu při 257 nm k absorbanci v minimu při 261 nm je 2,00 až 2,20. Zkoušku lze hodnotit, není-li poměr při zkoušce rozlišovací schopnost *(2.2.25)* nižší než 2,0.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *primidonu CRL*. Zkouší se látky ve formě tablet připravených s *bromidem draselným R*.

C. 0,1 g se rozpustí v 5 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (0,05 g/l) ve směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (4 + 9); zahříváním vzniká růžově modré zbarvení.

D. 0,2 g se smíchá s 0,2 g *uhličitanu sodného bezvodého R* a zahřívá se, dokud směs neroztaje; vyvíjí se amoniak, který se dokáže čichem a alkalickou reakcí *(2.2.4)*.

Zkoušky na čistotu

Látky rozpustné ve vodě absorbující ultrafialové záření. Ke 2,0 g se přidá 50 ml *vody R* a zahřívá se ve vodní lázni 30 min za občasného protřepání. Roztok se ochladí na 20 °C a zfiltruje se. Filtr se promyje 10 ml *vody R* 20 °C teplé a spojené filtráty se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku měřená v maximu při 257 nm není větší než 0,35.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

60,0 mg se rozpustí zahřátím v 70 ml *lihu 96% R*, ochladí se a zředí se *lihem 96% R* na 100,0 ml. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 60,0 mg *primidonu CRL*. Změří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 257 nm.

Z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků se vypočítá obsah $C_{12}H_{14}N_2O_2$.

Uchovávání

Separandum.

Primulae radix

N

Prvosenkový kořen

Synonymum. Radix primulae

Je to celý nebo řezaný usušený oddenek s kořeny druhu *Primula veris* L. anebo *Primula elatior* (L.) HILL.

Vlastnosti

Droga slabého pachu a nakyslé chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Hrubě bradavčitý šedohnědý oddenek, přímý nebo slabě zakřivený, asi 1 cm až 5 cm dlouhý a asi 2 mm až 4 mm silný. Hlava oddenku často pokryta zbytky stonků a listů. Oddenek porostlý četnými, křehkými kořeny, asi 1 mm silnými a obvykle 6 cm až 8 cm dlouhými. Kořeny druhu *Primula elatior* jsou světle hnědé až červenohnědé, kořeny druhu *Primula veris* jsou žluté až nažloutlé. Lom hladký.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS* a ve *vodě R* (určení škrobu). Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky parenchymu z kůry kořene; kůra a dřeň oddenku z okrouhlých buněk, se ztlustlými, tečkovanými stěnami; nahnědlé úlomky pokožky oddenku s vlasovými kořínky; síťovitě ztlustlé cévy; škrobová zrna různé velikosti a tvaru buď jednotlivá, nebo ve skupinách; skupiny žlutozelených, silně tečkovaných kamenných buněk jsou charakteristické pro druh *Primula elatior*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (500) se smíchá s 10 ml *lihu R* 70% (*V/V*) a zahřívá se 15 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 10 mg *escinu R* se rozpustí v 1,0 ml *lihu* 70% (*V/V*).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 20 μl obou roztoků a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *vody R* a *1-butanolu R* (1 + 4 + 5) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm, viz Zkoušky na čistotu *Cynanchum vincetoxicum*. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní polovině hlavní modrofialová skvrna odpovídající escinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou jedna až dvě intenzivně tmavofialové skvrny s hodnotami R_F nižšími než hodnota R_F hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další, slabě fialové, žluté a hnědozelené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Vyhovuje Zkoušce na cizí příměsi.

Cynanchum vincetoxicum. Chromatogram ze Zkoušky totožnosti C se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku nejsou světle modré nebo nazelenalé skvrny s hodnotou R_F nižší než hodnota R_F hlavní skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %. 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

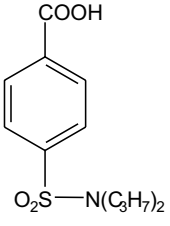
Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 11,0 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Probenecidum

Probenecid



$C_{13}H_{19}NO_4S$ M_r 285,36 CAS 57-66-9

Je to kyselina 4-(dipropylsulfamoyl)benzoová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{19}NO_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo malé krystaly.

Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v ethanolu, těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 197 °C až 202 °C.

B. 20 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a *lihu 96% R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 223 nm a 248 nm. Specifická absorbance v maximu při 248 nm je 310 až 350.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *probenecidu CRL*.

D. 0,2 g se rozpustí v co nejmenším potřebném množství *amoniaku zředěného RS2* (asi 0,6 ml). Přidají se 3 ml *dusičnanu stříbrného RS2;* vznikne bílá sraženina, která se rozpustí v přebytku amoniaku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. Ke 2,0 g se přidá 100 ml *vody R* a 30 min se zahřívá na vodní lázni. Doplní se na původní objem *vodou R*, ochladí se na pokojovou teplotu a zfiltruje se. K 50 ml se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *chloroformu R*, *diisopropyletheru R* a *toluenu R* (10 + 15 + 20 + 55) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí třepáním, a je-li třeba zahřátím, v 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,54 mg $C_{13}H_{19}NO_4S$.

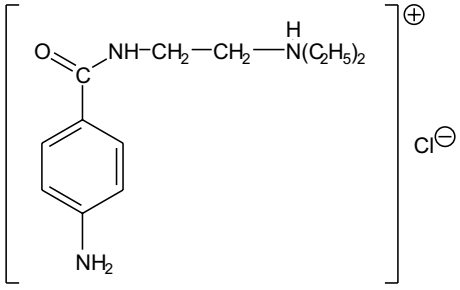
Uchovávání

Separandum.

† Procainamidi hydrochloridum

Prokainamidiumchlorid

Synonymum. Procainamidium chloratum



$C_{13}H_{22}ClN_3O$ M_r 271,79 CAS 614-39-1

Je to [2-(4-aminobenzamido)ethyl]diethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{22}ClN_3O$.

Vlastnosti

Bílý nebo velmi slabě žlutý krystalický prášek. Je hygroskopický, velmi dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 166 °C až 170 °C.

B. 10,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 273 nm. Specifická absorbance v maximu je 580 až 610.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prokainamidiumchloridu CRL*.

D. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 5 ml. Tento roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

E. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 2 ml. 1 ml tohoto roztoku vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_6 (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,6 až 6,3; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 200 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (15 + 30 + 60) po dráze 12 cm. Vrstva se vysuší proudem studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a provede se stanovení primárních aromatických aminů (*2.5.8*).

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,18 mg $C_{13}H_{22}ClN_3O$.

Uchovávání

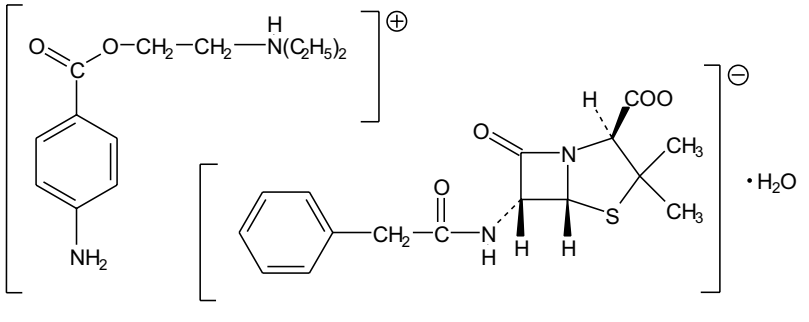
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Procaini benzylpenicillinum

1998

Prokain-benzylpenicilin

Synonyma. Benzylpenicillinum procainum, Benzylpenicillinum procainicum, Procainum penicillinum G



$C_{29}H_{38}N_4O_6S$. H_2O M_r 588,72 CAS 6130-64-9
M_r bezvodého 570,70

Je to monohydrát soli kyseliny (6*R*)-6-(2-fenylacetamido)penicilanové s 2-(4-aminobenzoyloxy)-diethylaminem. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 96,0 % až 102,0 % prokain-benzylpenicilinu (počítáno jako $C_{29}H_{38}N_4O_6S$) a 39,0 % až 42,0 % prokainu ($C_{13}H_{20}N_2O_2$; M_r 236,31). Může být přidán stabilizátor disperze nebo suspenze částic (např. lecithin, polysorbát 80).

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 95%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *prokain-benzylpenicilinu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H silanizovaného R.*

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v 5 ml *acetonu R.*
Porovnávací roztok. 25 mg *prokain-benzylpenicilinu CRL* se rozpustí v 5 ml *acetonu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 7,0 *amoniakem 17,5% RS*, (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu, vystaví se působení par jodu do vzniku skvrn a pozoruje se na denním světle. Dvě hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají svou polohou, zbarvením a velikostí dvěma hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg zkoušené látky se převedou do zkumavky dlouhé asi 150 mm a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml roztoku *formaldehydu v kyselině sírové RS.* Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je prakticky bezbarvý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká červenohnědé zbarvení.

D. 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Vzniklý roztok, který může být zakalený, vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,5; měří se následující roztok: 50 mg se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*, zředí se jí na 15 ml a protřepává se do úplného rozpuštění.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +165° až +180°, počítáno na bezvodou látku; měří se následující roztok: 0,250 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) postupem uvedeným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (c). Citlivost systému se upraví tak, aby výška píku odpovídajícího benzylpenicilinu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku (a) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času píku benzylpenicilinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha píku odpovídajícího kyselině 4-aminobenzoové není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,024 %); plocha žádného píku, kromě dvou hlavních píků a pí-

ku odpovídajícího kyselině 4-aminobenzoové, není větší než plocha píku odpovídajícího benzylpenicilinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Voda (*2.5.12*). 2,8 % až 4,2 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje nitrožilně 0,5 ml roztoku zkoušené látky (5 mg/ml) v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) ve *vodě na injekci R.*

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Roztoky se připravují těsně před použitím.*

Zkoušený roztok (a). 70,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 70,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 70,0 mg *prokain-benzylpenicilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 4,0 mg *kyseliny 4-aminobenzoové CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 16,8 mg *kyseliny 4-aminobenzoové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze o průtokové rychlosti 1,75 ml/min, která je směsí připravenou následujícím způsobem: smíchá se 250 ml *acetonitrilu R*, 250 ml *vody R* a 500 ml roztoku obsahujícího 14 g/l *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 6,5 g/l *tetrabutylamoniumhydroxidu R*, jehož hodnota pH se upraví na 7,0 *hydroxidem draselným 1 mol/l RS;* je-li třeba, upraví se hodnota pH na 7,2 *kyselinou fosforečnou zředěnou RS.*
- spektrofotometrického detektoru, 225 nm.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (b). Když se chromatogram zaznamená za uvedených podmínek, látky se eluují v následujícím pořadí: kyselina 4-aminobenzoová, prokain, benzylpenicilin. Citlivost systému se upraví tak, aby výška píku odpovídajícího kyselině 4-aminobenzoové byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi prvním píkem (kyselina 4-aminobenzoová) a druhým píkem (prokain) je nejméně 2,0. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi. Nastříkne se porovnávací roztok (a) šestkrát. Zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka pro plochy dvou píků není větší než 1,0 %. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

Vypočítá se procentuální obsah prokainu a prokain-benzylpenicilinu.

Uchovávání

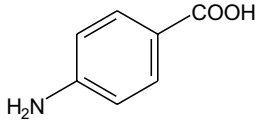
Ve vzduchotěsných obalech. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

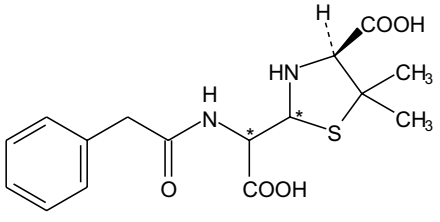
Označování

V označení na obalu se uvede název a množství přidaného stabilizátoru disperze nebo suspenze a zda je látka:
- sterilní,
- prostá pyrogenních látek.

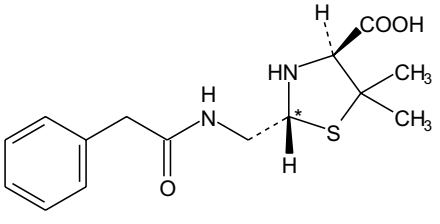
Nečistoty



A. kyselina 4-aminobenzoová,



B. kyselina (4*S*)-2-{karboxy[(fenylacetyl)amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny benzylpenicilinu),



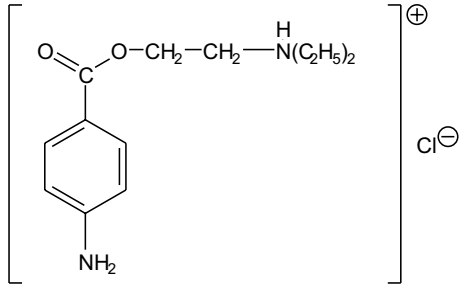
a epimer k C*

C. kyselina (2*RS*,4*S*)-2-{[(fenylacetyl)amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penilové kyseliny benzylpenicilinu).

† Procaini hydrochloridum

Prokainiumchlorid

Synonymum. Procainium chloratum



$C_{13}H_{21}ClN_2O_2$ M_r 272,77 CAS 51-05-8

Je to [2-(4-aminobenzoyloxy)ethyl]diethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{21}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 154 °C až 158 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prokainiumchloridu CRL*.

C. K asi 5 mg se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Po ochlazení se zbytek rozpustí v 5 ml *acetonu R*, přidá se 1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,1 mol/l RS;* vzniká pouze hnědočervené zbarvení.

D. K 0,2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 2 ml *vody R*, 0,5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a protřepe se. Přidá se 1 ml roztoku *manganistanu draselného R* (1 g/l); roztok se okamžitě odbarví.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

F. 1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku vyhovují zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se roztok připravený zředěním 4 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *4-aminobenzoové kyseliny R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *hexanu R* a *dibutyletheru R* (4 + 16 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se 10 min suší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,05 %). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku zůstává na startu.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml. Provede se předfiltrace. 10,0 ml předfiltrátu vyhovuje limitní zkoušce E na těžké kovy (5 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a provede se stanovení primárních aromatických aminů (*2.5.8*).

1,0 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,28 mg $C_{13}H_{21}ClN_2O_2$.

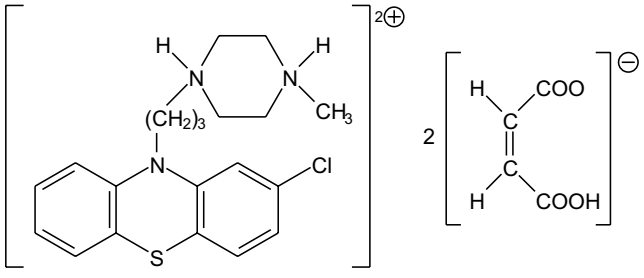
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Prochlorperazini hydrogenomaleas

Prochlorperaziniumhydrogenmaleinat

Synonyma. Prochlorperazini maleas, Prochlorperazinium hydrogenmaleinicum, hydrogenmaleinan prochlorperazinia



$C_{28}H_{32}ClN_3O_8S$ M_r 606,09 CAS 84-02-6

Je to 1-methyl-4-[3-(2-chlor-10-fenothiazinyl)propyl]piperazinium-bis(hydrogenmaleinat). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{28}H_{32}ClN_3O_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, C a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. *Zkouška se provede za ochrany před světlem.* 50,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 500,0 ml. Měří se ihned absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 280 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 305 nm. 10,0 ml roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se ihned absorbance roztoku při 230 nm až 280 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 255 nm. Specifická absorbance v maximu při 255 nm je 525 až 575.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *prochlorperaziniumhydrogenmaleinatu CRL.*

C. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.3)* s následující modifikací.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok. 20 mg *prochlorperaziniumhydrogenmaleinatu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *chloroformu R* a *methanolu R* a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 4 μl každého roztoku.

D. 0,2 g se v dělicí nálevce smíchá se směsí 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 3 ml *vody R* a protřepe se třikrát s 5 ml *etheru R*. K 0,1 ml vodné vrstvy se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni; nevzniká žádné zbarvení. Ke zbytku vodné vrstvy se přidají 2 ml *bromové vody RS*, zahřívá se 15 min ve vodní lázni a potom se nadbytek bromu vyvaří. Po ochlazení se k 0,1 ml takto připraveného roztoku přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni; vzniká modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 4,0; měří se čerstvě připravený nasycený roztok ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*.

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Roztok se připraví bezprostředně před použitím.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 200 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, *diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrnám zůstávajícím na startu.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g upráškované zkoušené látky se zahřátím na vodní lázni rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a nechá se ochladit na pokojovou teplotu. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

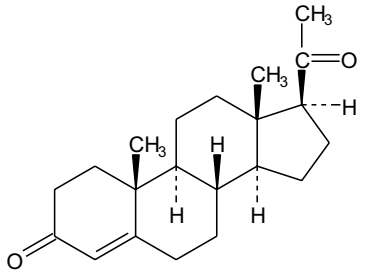
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,31 mg $C_{28}H_{32}ClN_3O_8S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Progesteronum

Progesteron



$C_{21}H_{30}O_2$ M_r 314,47 CAS 57-83-0

Je to 4-pregnen-3,20-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{21}H_{30}O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu, mírně rozpustný v acetonu, v etheru a v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 128 °C až 132 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *progesteronu CRL*. Pokud se získaná spektra zkoušené látky a referenční látky v pevném stavu liší, zaznamenají se odděleně nová spektra za použití roztoků obou látek v *chloroformu R* (50 g/l).

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *progesteronu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *chloroformu R* (33 + 66) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS,* 15 min se zahřívá při 120 °C a nechá se vychladnout. Vrstva se pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením při denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +186° až +194°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *chloroformu R* (33 + 66) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se nasyceným roztokem *dichromanu draselného R* ve směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (30 + 70), 30 min se zahřívá při 130 °C a nechá se vychladnout. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

25,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241 nm.

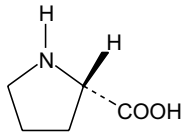
Vypočítá se obsah $C_{21}H_{30}O_2$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 535.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Prolinum

Prolin



$C_5H_9NO_2$ M_r 115,13 CAS 147-85-3

Je to kyselina (*S*)-2-pyrrolidinkarboxylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_9NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *prolinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -84,0° až -86,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *prolinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *prolinu CRL* a 10 mg *treoninu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, vysuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka ze dvou hodinových sklíček o průměru 60 mm umístěných okraji na sobě. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s lakmusovým papírem se ihned přiloží na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívají se 15 min při 40 °C. Lakmusový papír není intenzivněji modře zbarvený než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K připravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.2.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědavě žlutého zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,51 mg $C_5H_9NO_2$.

Uchovávání

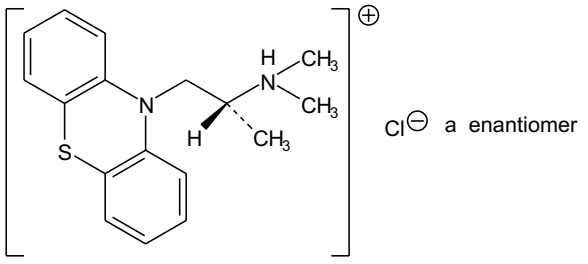
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Promethazini hydrochloridum

1998

Promethaziniumchlorid

Synonymum. Promethazinium chloratum



$C_{17}H_{21}ClN_2S$ M_r 320,88 CAS 58-33-3

Je to (2*RS*)-2-[1-(10*H*-fenothiazinyl)propyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{21}ClN_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Taje při asi 222 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *promethaziniumchloridu CRL.*

B. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.3*).

C. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *vody R* a po kapkách se přidá 1 ml *kyseliny dusičné R;* vzniká sraženina, která se rychle rozpouští na červeně zbarvený roztok, jehož zbarvení se mění na oranžové a pak na žluté. Roztok se zahřeje k varu; zbarvení roztoku přechází na oranžové a vzniká oranžově červená sraženina.

D. Vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 5,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml. Roztok se měří ihned po přípravě.

Příbuzné látky. *Zkouška se provádí za ochrany před světlem a roztoky se připravují těsně před použitím.*

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *isopromethaziniumchloridu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,2 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *diethylaminu R, acetonu R* a *cyklohexanu R* (5 + 10 + 85) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Nepřihlíží se ke skvrně zůstávající na startu.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající isopromethazinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající isopromethazinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýš tři takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g se rozpustí v 5 ml *vody R,* přidá se 5 ml *acetonu R,* 5 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a provede se předfiltrace. Předfiltrát vyhovuje limitní zkoušce E na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 5 ml základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí ve směsi 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 50 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*. Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

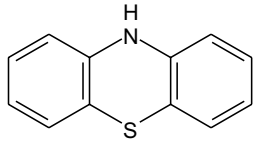
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 32,09 mg $C_{17}H_{21}ClN_2S$.

Uchovávání

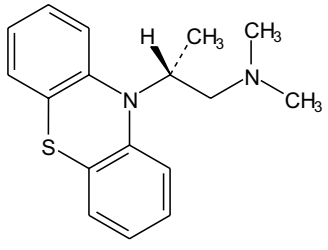
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

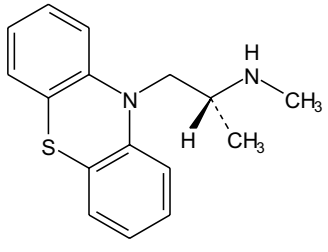


A. fenothiazin,



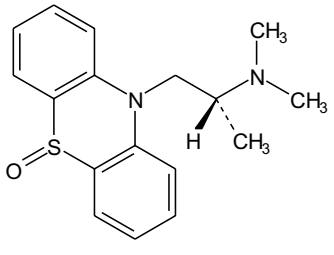
a enantiomer

B. (2*RS*)-N,N-dimethyl-2-(10*H*-fenothiazin-10-yl)propan-1-amin,



a enantiomer

C. (2*RS*)-N-methyl-1-(10*H*-fenothiazin-10-yl)propan-2-amin (isopromethazin),

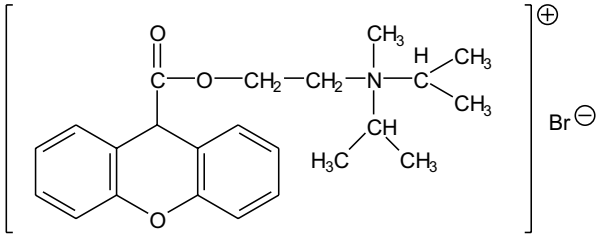


a enantiomer

D. S-oxid (2*RS*)-N,N-dimethyl-1-(10*H*-fenothiazin-10-yl)propan-2-aminu.

† Propanthelini bromidum

Propantheliniumbromid



$C_{23}H_{30}BrNO_3$ M_r 448,40 CAS 50-34-0

Je to N,N-diisopropyl-N-methyl-N-[2-(9*H*-xanthen-9-ylkarbonyloxy)ethyl]amoniumbromid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{30}BrNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý prášek, slabě hygroskopický. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. 60 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 246 nm a 282 nm. Specifická absorbance v maximu při 246 nm je 115 až 125 a v maximu při 282 nm je 57 až 63.

B. 0,2 g se rozpustí v 15 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*, asi 2 min se vaří a mírně se ochladí. K roztoku se přidá 7,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Zbytek se promyje *vodou R* a rekrystaluje z *lihu R* 50% (*V/V*) a 1 h se suší při 100 °C až 105 °C. Asi 10 mg tohoto zbytku se rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové R*. Vzniklý roztok je intenzivně žlutý a v ultrafialovém světle při 365 nm vykazuje žlutozelenou fluorescenci.

C. 50 mg se rozpustí v 0,1 ml *vody R* v 25ml baňce a přidá se 1 ml nasyceného roztoku *manganistanu draselného R*. K baňce se připojí frakcionační kolona a chladič zakončený trubicí ponořenou do 1 ml *vody R* ve zkumavce, která je umístěna v ledové lázni. Prudce se zahřívá a destiluje se ještě 1 min po uplném oddestilování kapaliny. Provede se slepá zkouška s množstvím *vody R*, které odpovídá množství destilátu. Obě zkumavky se umístí do ledové lázně a do každé zkumavky se přidá 0,5 ml roztoku *morfolinu R* 20% (*V/V*) a 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l). Zamíchá se a nechá se 5 min stát při 0 °C a 3 min při pokojové teplotě; v žádné zkumavce nevznikne modré zabarvení. Potom se přidá 1 g *síranu amonného R*, zamíchá se a nechá se 15 min stát; ve zkoušeném roztoku vznikne stálé růžové zbarvení, kontrolní roztok získaný při slepé zkoušce je zbarven hnědožlutě.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na bromidy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,6 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*).

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 6 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Zkoušený roztok (b). 6 mg se rozpustí ve 30 ml směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60), přidá se 5 ml porovnávacího roztoku (b) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Zkoušený roztok (c). 6 mg *xanthydrolu R1* a 6 mg zkoušené látky se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 6 mg *xanthydrolu R1* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60) a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (40 + 60) na 50 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku obsahujícího *chloristan sodný R* (28 g/l) a *kyselinu fosforečnou R* (11 g/l), jehož hodnota pH byla upravena na 3,8 nejdříve *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* a potom *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS.* Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 206 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem propanthelinu a píkem xanthydrolu je nejméně 8,0.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku (a), 20 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl zkoušeného roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času propanthelinu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádný pík odpovídající hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku xanthydrolu, není větší než plocha píku xanthydrolu (1,0 %); a nejvýše jedna taková plocha píku je stejná nebo je větší než polovina píku xanthydrolu (0,5 %). Nepřihlíží se k píku s relativním retenčním časem menším než 0,2 vzhledem k propanthelinu (bromid).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 44,84 mg $C_{23}H_{30}BrNO_3$.

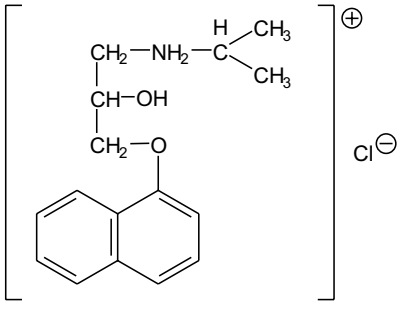
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Propranololi hydrochloridum

Propranololiumchlorid

Synonymum. Propranololium chloratum



$C_{16}H_{22}ClNO_2$ M_r 295,81 CAS 318-98-9

Je to (*RS*)-[2-hydroxy-3-(1-naftyloxy)propyl]isopropylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{22}ClNO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 163 °C až 166 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *propranololiumchloridu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.
Porovnávací roztok. 10 mg *propranololiumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R* a *methanolu R* (1 + 99) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C, postříká se *anisaldehydem RS* a zahřívá se při 100 °C až 105 °C, až zbarvení skvrn dosáhne maximální intenzity (10 min až 15 min). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje svou polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji, než je stupeň zbarvení 6 nejvhodnějšího porovnávacího barevného roztoku *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,20 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml. Přidá se 0,2 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený. Přidá se 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Rozpouštěcí směs. 1,15 g *laurylsíranu sodného R* se smíchá s 10 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (1 + 9), 20 ml roztoku *tetrabutylamoniumdihydrogenfosfatu R* (17 g/l), 370 ml *vody R* a 600 ml *acetonitrilu R*. pH roztoku se upraví *hydroxidem sodným zředěným RS* na hodnotu 3,3.
Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *propranololiumchloridu pro vykonávanou zkoušku CRL* a 2 mg *fenanthrenu R* se rozpustí v rozpouštěcí směsi a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí rozpouštěcí směsí na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,2 m dlouhé a vnitřního průměru 5 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- rozpouštěcí směsi jako mobilní fáze při průtokové rychlosti 1,8 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 292 nm, se zabudovanou průtokovou kyvetou o objemu 10 µl.

Pro předběžné stanovení se nastříkne 10 µl porovnávacího roztoku (a) za použití stříkačky nebo injektorové smyčky. Na chromatogramu by měly být patrny dobře oddělené píky s retenčním časem asi 1,8 min (propranolol nečistota A), 2,5 min (propranolol), 8 min (propranolol nečistota B) a 10 min (fenanthren). Není-li takového dělení dosaženo, přizpůsobí se složení mobilní fáze: nejprve se upraví koncentrace acetonitrilu, aby retenční čas fenanthrenu byl 10 min (při zvýšení koncentrace se sníží retenční čas a naopak); pak se upraví koncentrace laurylsíranu sodného, aby retenční čas propranololu nečistoty B byl 8 min (při zvýšení koncentrace se zvýší retenční čas a naopak); nejsou-li píky propranololu nečistoty A a propranololu oddělené, upraví se mírně koncentrace acetonitrilu, aby bylo dosaženo oddělení píků. Citlivost zesilovače se nastaví tak, aby byla výchylka *(A)* pro pík propranololu nečistoty A alespoň 50 % stupnice zapisovače (měřeno od základní linie). Změří se výška *(B)* nejnižšího bodu křivky oddělující tento pík od píku propranololu nad základní linií. Zkoušku lze hodnotit, pokud *B* je menší než 25 % *A*.

Nastříkne se po 10 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu dvojnásobku retenčního času fenanthrenu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší, než je polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %); součet ploch píků, kromě hlavního píku, není větší, než je dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (15 + 85) a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 µg/g). Připraví se porovnávací roztok olova (1 µg Pb/ml), který byl připraven ředěním základního *roztoku olova (100 µg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (15 + 85).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

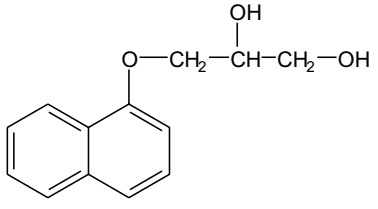
0,250 g se rozpustí v 25 ml *lihu 96% R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,58 mg $C_{16}H_{22}ClNO_2$.

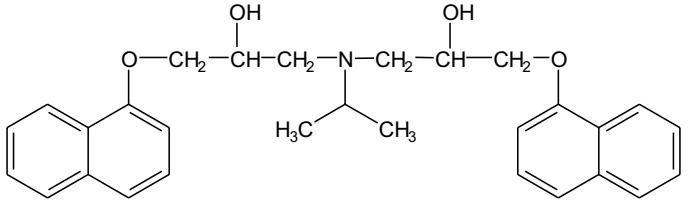
Uchovávání

Separandum.

Nečistoty



A. 3-(1-naftyloxy)propan-1,2-diol (diol),



B. 4-isopropyl-1,7-bis(1-naftyloxy)-4-azaheptan-2,6-diol (terciární amin).

Propylenglycoli monostearas

Propylenglykolmonostearat

CAS 1323-39-3

Je to směs propylenglykolmonoesterů a propylenglykoldiesterů kyseliny stearové a palmitové. Obsahuje nejméně 50 % monoesterů připravených kondenzací propylenglykolu a kyseliny stearové.

Výroba

Je-li propylenglykolmonostearat vyráběn z loje, musí zvířata, ze kterých je lůj získáván, splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro humánní konzumaci. Pokud se pro výrobu použije tkáň bovinního původu, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí

tkáně, jež se má použít, se má vzít v úvahu relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské Unie "Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosu původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků" (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Vlastnosti

Bílá nebo téměř bílá voskovitá pevná hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v horkém lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Teplota tání, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Zkoušený roztok. K 2,5 g se přidá 40 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Přidá se 30 ml *vody R*, oddestiluje se líh, k horké směsi se přidá 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, ochladí se a protřepe se s 50 ml *etheru R*. Horní vrstva se promyje třikrát 10 ml *chloridu sodného RS*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se vysuší za sníženého tlaku.

Porovnávací roztok. 0,25 g *methylpalmitatu R* a 0,25 g *methylstearatu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

K 0,1 g zbytku v baňce se přidá 5 ml roztoku *fluoridu boritého R (*140 g/l) v *methanolu R* a zahřívá se 15 min pod zpětným chladičem. Ochladí se a převede se do dělicí nálevky s 10 ml *hexanu R*. Přidá se 10 ml nasyceného roztoku *chloridu sodného R* a 10 ml *vody R*. Protřepe se, spodní vrstva se odstraní a horní vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (100 μm až 115 μm), impregnovanou *makrogolsukcinatem R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 170 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je 220 °C. Nastříkne se 1 μl každého roztoku. Retenční časy a velikosti dvou hlavních píků na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou přibližně shodné s retenčními časy a velikostí hlavních píků na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Zkouška Stanovení obsahu (obsah monoesterů) je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Teplota tání *(2.2.15)*. 33 °C až 40 °C.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 4,0; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 3,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 170 až 180; stanoví se s 2,0 g zkoušené látky.

Volný propylenglykol. Nejvýše 5,0 %; stanoví se postupem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 5,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se obsah volného propylenglykolu a monoesterů vylučovací chromatografií *(2.2.30)*.

Zkoušený roztok. Do 15ml baňky se naváží asi 0,2 g (*m*) s přesností na 0,1 mg. Přidá se 5 ml *tetrahydrofuranu R* a třepe se do rozpuštění, je-li třeba, mírně se zahřeje. Baňka se znovu zváží a vypočítá se celková hmotnost rozpouštědla a zkoušené látky (*M*).

Porovnávací roztok. Do čtyř 15ml baněk se postupně naváží s přesností na 0,1 mg asi 2,5 mg, 5,0 mg, 10,0 mg a 20,0 mg *propylenglykolu R*. Přidá se po 5 ml *tetrahydrofuranu R* a třepe se do úplného promíchání. Baňky se znovu zváží a vypočítá se koncentrace propylenglykolu v mg/g pro každý porovnávací roztok.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony pro gelovou chromatografii délky 0,6 m a vnitřního průměru 7 mm naplněné *styren-divinylbenzen kopolymerem R* (tloušťka filmu 5 μm, porozita 10 nm),
- mobilní fáze, kterou je *tetrahydrofuran R*, s průtokovou rychlostí 1 ml/min,
- diferenčního refraktometrického detektoru,
- integrátoru.

Nastříkne se 40 μl zkoušeného roztoku a 40 μl každého porovnávacího roztoku. Koncentrace propylenglykolu ve zkoušeném roztoku (*C*) se stanoví z kalibrační křivky získané za použití porovnávacích roztoků.

Obsah volného propylenglykolu ve zkoušené látce se vypočítá v procentech podle vzorce:

$$\frac{C \,.\, M}{m \,.\, 10} \,.$$

Z plochy píku monoesterů (*A*) a diesterů (*B*) se vypočte procentuální obsah monoesterů podle vzorce:

$$\frac{A}{A + B} \,.\, [100 - (\%\ \textit{volného propylenglykolu} + \%\ \textit{volných mastných kyselin})] \,,$$

v němž:

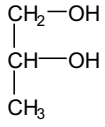
$$\%\ \textit{volných mastných kyselin} = \frac{\textit{číslo kyselosti} \,.\, 270}{561{,}1} \,.$$

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Propylenglycolum

Propylenglykol



$C_3H_8O_2$ M_r 76,10 CAS 57-55-6

Je to (*RS*)-1,2-propandiol.

Vlastnosti

Viskózní čirá bezbarvá hygroskopická kapalina. Je mísitelný s vodou a s lihem 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Relativní hustota, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Teplota varu (*2.2.12*). 184 °C až 189 °C.

D. K 0,5 ml se přidá 5 ml *pyridinu R* a 2 g jemně rozetřeného *nitrobenzoylchloridu R*, 1 min se vaří a naleje se za třepání do 15 ml studené *vody R*. Zfiltruje se a sraženina se promyje 20 ml nasyceného roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R*, potom *vodou R* a vysuší se. Rozpustí se ve vroucím *lihu R* 80% (*V/V*) a za horka se zfiltruje. Po ochlazení se tvoří krystaly, které po vysušení při 100 °C až 105 °C tají (*2.2.14*) při 123 °C až 128 °C.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Je to čirá (*2.2.1*) a bezbarvá (*2.2.2, Metoda II*) kapalina.

Index lomu (*2.2.6*). 1,431 až 1,433.

Relativní hustota (*2.2.5*). 1,035 až 1,040.

Kysele reagující látky. K 10 ml se přidá 40 ml *vody R* a 0,1 ml *modře bromthymolové RS1;* roztok je zelenožlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Oxidující látky. K 10 ml se přidá 5 ml *vody R*, 2 ml *jodidu draselného RS* a 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a tato směs se uzavře v baňce se zabroušenou zátkou. Baňka se umístí na 15 min do temna a potom se titruje *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru. Spotřebuje se nejvýše 0,2 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS*.

Redukující látky. K 1 ml se přidá 1 ml *amoniaku zředěného RS1* a zahřívá se na vodní lázni při 60 °C po dobu 5 min; roztok není žlutý. Ihned se přidá 0,15 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a nechá se 5 min stát; roztok nemění svůj vzhled.

Těžké kovy (*2.4.8*). 3 ml se smíchají s 12 ml *vody R*. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (5 μg/ml). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). 50 g se zahřívá do spálení, vyžíhá se a nechá se ochladit. Zbytek se zvlhčí *kyselinou sírovou R* a vyžíhá se. Tento postup se opakuje. Hmotnost zbytku je nejvýše 5 mg (0,01 %).

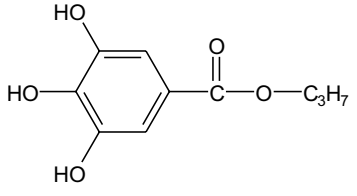
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Propylis gallas

Propylgallat

Synonymum. Propylum gallicum



$C_{10}H_{12}O_5$ M_r 212,20 CAS 121-79-9

Je to propylester kyseliny 3,4,5-trihydroxybenzoové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{10}H_{12}O_5$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v etheru a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 148 °C až 151 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *propylgalatu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Kyselina gallová. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí v 10 ml *vody R* zahříváním asi na 70 °C. Roztok se ochladí a přidá se 1 ml *dusičnan-oxidu bismutitého RS;* vznikne světle žlutá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací roztok $HŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kyselina gallová. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *propylgallatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *kyseliny gallové R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 20 ml. 1 ml se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí porovnávacím roztokem (b) na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *ethylformiatu R* a *toluenu R* (10 + 40 + 50) po dráze 8 cm. Vrstva se 10 min suší na vzduchu a postříká se směsí objemových dílů *chloridu železitého RS1* a *lihu 96% R* (1 + 9). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) nepřevyšuje skvrna odpovídající kyselině gallové intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Celkový chlor. 0,5 g se smíchá s 2 g *uhličitanu vápenatého R*. Vysuší se a vyžíhá při 800 °C. Zbytek se smíchá s 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 30 ml. 15 ml tohoto roztoku bez dalšího přidání *kyseliny dusičné zředěné RS* vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (*2.4.4*) (200 µg/g).

Chloridy (*2.4.4*). K 1,65 g se přidá 50 ml *vody R*, 5 min se třepe a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Zinek. Nejvýše 25 µg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. K 2,5 ml roztoku získaného při zkoušce na těžké kovy se přidá 2,5 ml *vody R*.
Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky za použití základního *roztoku zinku (10 µg Zn/ml)*, v případě potřeby se zředí *vodou R*.

Změří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

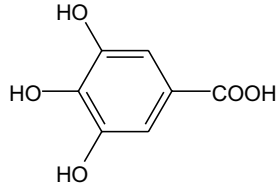
0,400 g se rozpustí ve 150 ml *vody R* zahřáté asi na 70 °C. Zahřeje se k varu a přidá se za stálého míchání 50,0 ml *dusičnan-oxidu bismutitého RS*. Ochladí se a směs se převede kvantitativně do odměrné baňky na 250,0 ml a zředí se na objem roztokem *kyseliny dusičné R* 0,5% (*V/V*). Filtruje se, prvních 20 ml filtrátu se odstraní a provede se chelatometrické stanovení bismutu (*2.5.11*) za použití 100,0 ml filtrátu (n_1 ml). Provede se slepá zkouška (n_2 ml). Rozdíl ($n_2 - n_1$) mezi spotřebovanými objemy *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá hmotnosti $C_{10}H_{12}O_5$ obsažené v použitém objemu.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 21,22 mg $C_{10}H_{12}O_5$.

Uchovávání

V dobře uzavřeném obalu, chráněn před světlem.

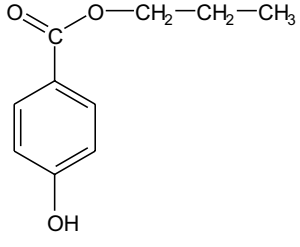
Nečistoty



A. kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová (kyselina gallová).

Propylparabenum

Propylparaben



$C_{10}H_{12}O_3$ M_r 180,20 CAS 94-13-3

Je to propyl-4-hydroxybenzoat. Obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{10}H_{12}O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 96 °C až 99 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *propylparabenu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. K asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS*, zahřeje se na 30 s k varu a ochladí se (roztok a). K dalším asi 10 mg se ve zkumavce přidá 1 ml *uhličitanu sodného RS;* látka se částečně rozpustí (roztok b). K roztokům (a) a (b) se současně přidá 5 ml *aminopyrazolonu RS* a 1 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS* a promíchá se; roztok (b) je žlutý až oranžově hnědý; roztok (a) je oranžový až červený a jeho zbarvení je zřetelně intenzivnější než zbarvení roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. Ke 2 ml roztoku S se přidají 3 ml *lihu 96% R*, 5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *zeleně bromkresolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanizovaného s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *propylparabenu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *ethylparabenu CRL* se rozpustí v 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, vody R* a *methanolu R* (1 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se odváží do baňky se zábrusem, přidá se 40,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Ochladí se na pokojovou teplotu, zpětný chladič se propláchne 5 ml *vody R* a promývací tekutina se přidá do baňky. Nadbytek hydroxidu sodného se titruje *kyselinou sírovou 0,5 mol/l VS* a pokračuje se v titraci za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)* do druhé inflexe. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* odpovídá 180,2 mg $C_{10}H_{12}O_3$.

Uchovávání

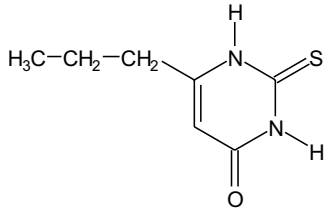
V dobře uzavřených obalech.

Nečistoty

A. kyselina 4-hydroxybenzoová,
B. methyl-4-hydroxybenzoat (methylparaben),
C. ethyl-4-hydroxybenzoat (ethylparaben),
D. butyl-4-hydroxybenzoat (butylparaben).

† Propylthiouracilum

Propylthiouracil



$C_7H_{10}N_2OS$ M_r 170,23 CAS 51-52-5

Je to 2,3-dihydro-6-propyl-2-thioxo-4(1*H*)-pyrimidinon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_7H_{10}N_2OS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 217 °C až 221 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *propylthiouracilu CRL*. Zkouší se tablety připravené z 1 mg látky a 0,3 g *bromidu draselného R*.

C. Chromatogramy získané při zkoušce Thiomočovina a příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm před vystavením vrstvy parám jodu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 20 mg se přidá 8 ml *bromové vody R* a několik minut se protřepává. Pak se vaří do odbarvení směsi, nechá se vychladnout a zfiltruje se. K filtrátu se přidají 2 ml *chloridu barnatého RS1;* tvoří se bílá sraženina, která se po přidání 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* nezbarví fialově.

Zkoušky na čistotu

Thiomočovina a příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *propylthiouracilu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *thiomočoviny R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, 2-propanolu R* a *chloroformu R* (0,1 + 6 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Vrstva se pak vystaví na 10 min parám jodu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není skvrna odpovídající thiomočovině intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající thiomočovině, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí v co nejmenším množství *amoniaku zředěného RS1* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

K 0,300 g se přidá 30 ml *vody R*, 30,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a vaří se za protřepávání do úplného rozpuštění. Přidá se za míchání 50 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, mírně se povaří a ochladí. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* je součtem objemu přidaného na začátku stanovení a objemu použitého při konečné titraci.

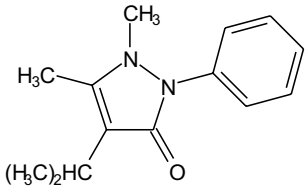
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,511 mg $C_7H_{10}N_2OS$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Propyphenazonum

Propyfenazon



$C_{14}H_{18}N_2O$ M_r 230,31 CAS 479-92-5

Je to 4-isopropyl-1,5-dimethyl-2-fenyl-3(2*H*)-pyrazolon. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{18}N_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu a v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 102 °C až 106 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *propyfenazonu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne hnědočervené zbarvení, které po přidání 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* se změní na žluté.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody prosté oxidu uhličitého R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je růžový. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok se odbarví. Přidá se 0,2 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžový nebo červený.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,40 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 80 mg *propyfenazonu CRL* se rozpustí v *methanolu R* zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *1-butanolu R*, *cyklohexanu R* a *ethylacetatu R* (10 + 45 + 45) po dráze 15 cm. Vrstva se 15 min suší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Vrstva se postříká směsí stejných objemových dílů *hexakyanoželezitanu draselného RS* a *chloridu železitého RS1*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2000 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 75 ml *dichlorethanu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,03 g $C_{14}H_{18}N_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

---

† Protamini hydrochloridum

1998

Protaminiumchlorid

Je to směs hydrochloridů bazických peptidů, které se získávají extrakcí ze spermatu nebo jiker ryb (většinou druhu *Salmonidae* a *Clupeidae*). V roztoku se váže s heparinem, a tak inhibuje jeho protisrážlivý účinek. Za popsaných podmínek stanovení dává protaminiumchlorid sraženinu. Počítáno na vysušenou látku, 1 mg protaminiumchloridu vysráží nejméně 100 m.j. *sodné soli heparinu BRP*. Tento požadavek platí pro *sodnou sůl heparinu BRP* č. šarže 1, poněvadž účinnost protaminiumchloridu stanovená níže popsanou metodou závisí na účinnosti a průměrné molekulové hmotnosti použitého heparinu.

Výroba

Připravuje se v podmínkách, které minimalizují mikrobiální znečištění.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je hygroskopický, dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 1,000 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Specifická optická otáčivost (*2.2.7*) tohoto roztoku je -40° až -60°, počítáno na vysušenou látku.

B. Při zkoušce Stanovení obsahu tvoří sraženinu.

C. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 4,5 ml *vody R*, 1,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l) a 1,0 ml roztoku *1-naftolu R* (0,2 g/l) a promíchá se. Směs se ochladí na 5 °C a přidá se 0,5 ml *bromnanu sodného RS;* vznikne intenzivní červené zbarvení.

D. 2 ml roztoku S se zahřejí ve vodní lázni na 60 °C, přidá se 0,1 ml *síranu rtuťnatého RS* a promíchá se; nevznikne žádná sraženina. Ochladí se v ledové vodě; vznikne sraženina.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku S. Ke 2,5 ml roztoku S se přidá 7,5 ml *vody R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok $HŽ_6$ nebo $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Absorbance (*2.2.25*). 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5,0 ml. Absorbance roztoku měřená při 260 nm až 280 nm není větší než 0,1.

Dusík. 23,0 % až 27,0 %; počítáno na vysušenou látku. Stanoví se s 10,0 mg mineralizací *kyselinou sírovou* (*2.5.9*); zahřívá se 3 h až 4 h.

Chloridy. 12,3 % až 19,0 %; počítáno na vysušenou látku. 0,400 g se rozpustí v 50 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičňanu stříbrného 0,1 mol/l VS*, 2 ml *dibutylftalatu R* a směs se protřepe. Titruje se *thiokyanatem amonným 0,1 mol/l VS* za použití 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru. Intenzivně se třepe až po dosažení bodu ekvivalence.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,545 mg chloridu (Cl).

Sírany. Nejvýše 4,0 %; počítáno na vysušenou látku. 0,500 g se rozpustí ve 200 ml *vody destilované R*, přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se k varu. Pak se přidá po kapkách za stálého míchání skleněnou tyčinkou 10 ml horkého roztoku *chloridu barnatého R* (100 g/l). Baňka se zakryje hodinovým sklem a nechá se 2 h stát ve vodní lázni, aby se vytvořila hrubozrnná sraženina. K čiré supernatantní tekutině se přidá 0,1 ml roztoku *chloridu barnatého R* (100 g/l). Jestliže vznikne zákal, postup srážení se opakuje. Sraženina se kvantitativně přenese do předem vyžíhaného zváženého porcelánového kelímku a promývá se horkou *vodou destilovanou R* tak dlouho, až přidání *dusičnanu stříbrného RS1* k promývací vodě nevyvolá opalescenci. Kelímek se žíhá při 600 °C po dobu 1 h. Pak se vychladí v exsikátoru a zváží.

1,0 mg zbytku odpovídá 0,412 mg síranu (SO_4) ve zkoušené látce.

Baryum. Nejvýše 10 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 1,0 g látky se rozpustí ve *vodě destilované R*, přidá se 1 ml roztoku *chloridu cesného R (250 g/l)*, 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 20,0 ml.

Porovnávací roztok. K 1,0 ml základního *roztoku barya (50 μg Ba/ml)* se přidá 5 ml roztoku *chloridu cesného R* (250 g/l), 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.

Měří se absorbance při 553,3 nm za použití baryové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylen-oxidu dusného plamene vhodného složení.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo (*2.4.9*). 1,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Rtuť. Nejvýše 10 μg/g. 2,0 g se převedou do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 20 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny dusičné R* a *kyseliny sírové R*. Vaří se pod zpětným chladičem 1 h, pak se ochladí a opatrně zředí *vodou R*. Vaří se tak dlouho, až přestanou unikat páry dusíku. Ochlazený roztok se opatrně zředí *vodou R* na 200,0 ml, promíchá se a zfiltruje. 50,0 ml filtrátu se přenese do dělicí nálevky. Vytřepává se postupně s malými dávkami *chloroformu R*, až chloroformová vrstva zůstane bezbarvá. Chloroformové vrstvy se odstraní. K vodné vrstvě se přidá 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 115 ml *vody R* a 10 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (200 g/l). Titruje se *dithizonem RS2*. Po každém přidání se směsí dvacetkrát zatřepe a ke konci titrace se oddělí a odstraní chloroformová vrstva. Titruje se do vzniku modro-zeleného zbarvení. Množství rtuti se vypočítá za použití ekvivalentu v mikrogramech rtuti na mililitr titračního roztoku použitého při standardizaci *dithizonu RS2*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 3 h při 100 °C až 105 °C.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na kilogram hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku obsahujícího 10 mg zkoušené látky.

Neškodnost (*2.6.9*). Vyhovuje zkoušce na neškodnost. Každé myši se vstříkne 0,5 mg zkoušené látky rozpuštěné v 0,5 ml *vody na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Zkoušený roztok (a). 15,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 3,0 ml.
Zkoušený roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 3,0 ml.

Jako titrační roztok se použije *sodná sůl heparinu BRP* v šesti zředěních (např. 1,7 ml se zředí *vodou R* na 10,0 ml). Každý zkoušený roztok se titruje dvojmo následovně: přesně odměřené množství roztoku pro titraci, např. 1,5 ml, se převede do kyvety vhodného kolorimetru, nastaví se vhodná vlnová délka ve viditelné oblasti (není rozhodující) a přidává se v malých dávkách titrační roztok, až nastane prudké zvýšení absorbance; zaznamená se spotřeba titračního roztoku.

Provedou se tři nezávislá měření. Pro každou jednotlivou titraci se vypočítá množství m.j. heparinu v přidaném objemu na mg zkoušené látky. Výsledek stanovení účinnosti se vypočítá z průměru osmnácti hodnot. Linearita zkoušky se ověří běžnými statistickými metodami. Vypočítají se tři relativní směrodatné odchylky z výsledků každého ze tří zkoušených roztoků. Vypočítají se tři relativní směrodatné odchylky pro každé ze tří nezávislých stanovení účinnosti. Stanovení účinnosti lze hodnotit, jestliže průměrná relativní směrodatná odchylka počítaná z výsledků všech šesti relativních směrodatných odchylek je menší než 5 %.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zabezpečených obalech. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá pyrogenních látek.

† Protamini sulfas

1998

Protaminiumsulfat

CAS 9009-65-8

Je to směs síranů bazických peptidů, které se získávají extrakcí ze spermatu nebo jiker ryb (většinou druhu *Salmonidae* a *Clupeidae*). V roztoku se váže s heparinem, a tak inhibuje jeho protisrážlivý účinek. Za popsaných podmínek stanovení dává protaminiumsulfat sraženinu. Počítáno na vysušenou látku, 1 mg protaminiumsulfatu vysráží nejméně 100 m.j. *sodné soli heparinu BRP*. Tento požadavek platí pro *sodnou sůl heparinu BRP* č. šarže 1, protože účinnost protaminiumsulfatu stanovená níže popsanou metodou závisí na účinnosti a průměrné molekulové hmotnosti použitého heparinu.

Výroba

Připravuje se v podmínkách, které minimalizují mikrobiální znečištění.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je hygroskopický, mírně rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 1,000 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Specifická optická otáčivost (*2.2.7*) tohoto roztoku je -65° až -85°, počítáno na vysušenou látku.

B. Při zkoušce Stanovení účinnosti tvoří sraženinu.

C. K 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 4,5 ml *vody R*, 1,0 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l) a 1,0 ml roztoku *1-naftolu R* (0,2 g/l) a promíchá se. Směs se ochladí na 5 °C a přidá se 0,5 ml *bromnanu sodného RS;* vznikne intenzivní červené zbarvení.

D. 2 ml roztoku S se zahřejí ve vodní lázni na 60 °C, přidá se 0,1 ml *síranu rtuťnatého RS* a promíchá se; nevznikne žádná sraženina. Ochladí se v ledové vodě; vznikne sraženina.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,20 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku S. Ke 2,5 ml roztoku S se přidá 7,5 ml *vody R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok $HŽ_6$ nebo $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Absorbance (*2.2.25*). 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5,0 ml. Absorbance roztoku měřená při 260 nm až 280 nm je nejvýše 0,1.

Dusík. 21,0 % až 26,0 %; počítáno na vysušenou látku. Stanoví se s 10,0 mg mineralizací *kyselinou sírovou* (*2.5.9*); zahřívá se 3 h až 4 h.

Sírany. 16,0 % až 24,0 %, počítáno na vysušenou látku. 0,150 g se rozpustí v 15 ml *vody destilované R*, přidá se 5,0 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se k varu. Pak se přidá po kapkách za stálého míchání 10 ml roztoku *chloridu barnatého R* (100 g/l). Kádinka se zakryje hodinovým sklem a zahřívá se 1 h na vodní lázni. Zfiltruje se, sraženina se promyje několika malými částmi horké *vody R*, vysuší se a zbytek se žíhá při 600 °C do konstantní hmotnosti.

1,0 g zbytku odpovídá 0,4117 g síranu (SO_4) ve zkoušené látce.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Železo (*2.4.9*). 1,0 g se rozpustí zahřátím ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Rtuť. Nejvýše 10 μg/g. 2,0 g se převedou do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou, přidá se 20 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny dusičné R* a *kyseliny sírové R*. Vaří se pod zpětným chladičem 1 h, pak se ochladí a opatrně zředí *vodou R*. Vaří se tak dlouho, až přestanou unikat páry dusíku. Ochlazený roztok se opatrně zředí *vodou R* na 200,0 ml, promíchá se a zfiltruje. 50,0 ml filtrátu se přenese do dělicí nálevky. Vytřepává se postupně s malými dávkami *chloroformu R*, až chloroformová vrstva zůstane bezbarvá. Chloroformové vrstvy se odstraní. K vodní vrstvě se přidá 25 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 115 ml *vody R* a 10 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (200 g/l). Titruje se *dithizonem RS2*. Po každém přidání se směsí dvacetkrát zatřepe a ke konci titrace se oddělí a odstraní chloroformová vrstva. Titruje se do získání modro-zelené barvy. Množství rtuti se vypočítá za použití ekvivalentu v mikrogramech rtuti na mililitr titračního roztoku použitého při standardizaci *dithizonu RS2*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší 3 h při 100 °C až 105 °C.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na kilogram hmotnosti králíka 1,0 ml roztoku obsahujícího 10 mg zkoušené látky.

Neškodnost (*2.6.9*). Vyhovuje zkoušce na neškodnost. Každé myši se vstříkne 0,5 mg zkoušené látky rozpuštěné v 0,5 ml *vody na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Zkoušený roztok (a). 15,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 3,0 ml.
Zkoušený roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 3,0 ml.

Jako titrační roztok se použije *sodná sůl heparinu BRP* v šesti zředěních (např. 1,7 ml se zředí *vodou R* na 10,0 ml). Každý zkoušený roztok se titruje dvojmo následovně: přesně odměřené množství roztoku pro titraci, např. 1,5 ml, se převede do kyvety vhodného kolorimetru, nastaví se vhodná vlnová délka ve viditelné oblasti (není rozhodující) a přidává se v malých dávkách titrační roztok, až nastane prudké zvýšení absorbance; zaznamená se spotřeba titračního roztoku.

Provedou se tři nezávislá měření. Pro každou jednotlivou titraci se vypočítá množství m.j. heparinu v přidaném objemu na 1 mg zkoušené látky. Výsledek stanovení účinnosti se vypočítá z průměru osmnácti hodnot. Linearita zkoušky se ověří běžnými statistickými metodami. Vypočítají se tři relativní směrodatné odchylky z výsledků každého ze tří zkoušených roztoků. Vypočítají se tři relativní směrodatné odchylky pro každé ze tří nezávislých stanovení účinnosti. Stanovení účinnosti lze hodnotit pouze v případě, jestliže průměrná relativní směrodatná odchylka počítaná z výsledků všech šesti relativních směrodatných odchylek je menší než 5 %.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zabezpečených obalech. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

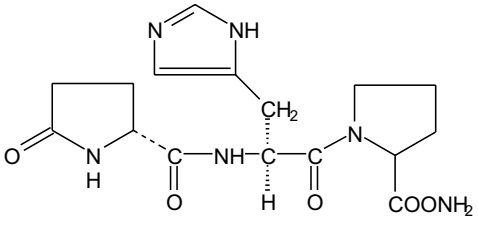
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá pyrogenních látek.

† Protirelinum

Protirelin



$C_{16}H_{22}N_6O_4$ M_r 362,39 CAS 24 305-27-9

Je to syntetický tripeptid 5-oxo-L-prolyl-L-histidyl-L-prolinamid, ve kterém je pořadí aminokyselin stejné jako v přírodním neurohormonu hypothalamu, který stimuluje uvolňování a syntézu thyrotropinu. Počítáno na bezvodou a kyseliny octové prostou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{16}H_{22}N_6O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *protirelinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku přibližně odpovídá retenčním časem a velikostí hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Roztok zkoušené látky (10 g/l) je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -62° až -70°, počítáno na bezvodou látku prostou kyseliny octové. 10 mg zkoušené látky se rozpustí v 1,0 ml *vody R*.

Příbuzné peptidy. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*) způsobem popsaným ve zkoušce Stanovení obsahu.

Zkoušený roztok. 5,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (a). Obsah lahvičky *D-His-protirelinu CRL* se rozpustí ve vhodném objemu mobilní fáze A tak, aby konečná koncentrace tohoto roztoku byla 1 mg/ml. Smíchají se stejné objemy tohoto roztoku a zkoušeného roztoku.
Porovnávací roztok (b). 0,2 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází A na 10,0 ml.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a). Pomocí porovnávacího chromatogramu *D-His-protirelinu CRL* se identifikují píky D-His-protirelinu a protirelinu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je rozlišení mezi píkem protirelinu a píkem D-His-protirelinu nejméně 2,5 a symetrie píku protirelinu je 0,9 až 1,2. Je-li třeba, upraví se počáteční složení mobilní fáze nebo profil gradientu.

Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byla nejméně 50 % rozsahu stupnice zapisovače.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a chromatogram se zaznamenává po dobu asi 40 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 1,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 7,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Kyselina octová. Nejvýše 2,0 %, stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *dioxanu R* jako vnitřního standardu.

Zkoušený roztok (a). 20,0 mg se rozpustí v 1,0 ml *vody R*.
Zkoušený roztok (b). 20,0 mg se rozpustí v 1,0 ml *vody R* a přidá se 10 μl *dioxanu R*.

Porovnávací roztok. 1,0 mg *kyseliny octové ledové R* se rozpustí v 1,0 ml *vody R* a přidá se 10 μl *dioxanu R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C.

Sterilita *(2.6.1)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,7 m.j. v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 5,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok. Obsah lahvičky *protirelinu CRL* se zředí mobilní fází A tak, aby konečná koncentrace tohoto roztoku byla 1,0 mg/ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm) (pórovitost 120 . 10^{-8}cm),
- mobilní fáze při průtoku 1 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - je to směs složená z 1900 ml *vody R*, 100 ml *acetonitrilu pro chromatografii R* a 2,0 g *oktansulfonanu sodného R* obsahující 2,5 ml/l *tetraethylamoniumhydroxidu RS*. Hodnota pH roztoku se upraví na 3,5 *kyselinou fosforečnou R*,
  - *mobilní fáze B* - je to směs složená z 1700 ml *vody R*, 300,0 ml *acetonitrilu pro chromatografii R* a 2,0 g *oktansulfonanu sodného R* obsahující 2,5 ml/l *tetraethylamoniumhydroxidu RS*. Hodnota pH roztoku se upraví na 3,5 *kyselinou fosforečnou R*,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0 - 30	74 → 41	26 → 59
30 - 35	41 → 74	59 → 26
35 - 50	74	26

- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Kolona se promývá směsí 74,0 % (*V/V*) mobilní fáze A a 26 % (*V/V*) mobilní fáze B.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu 40 min.

Obsah protirelinu ($C_{16}H_{22}N_6O_4$) se vypočítá z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a udaného obsahu $C_{16}H_{22}N_6O_4$ v *protirelinu CRL*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí, při teplotě 2 °C až 8 °C. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

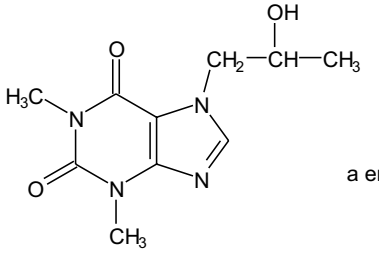
Označování

V označení na obalu se uvede:
- hmotnost peptidu v balení,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů,
- zda je látka sterilní.

† Proxyphyllinum

1998

Proxyfylin



a enantiomer

$C_{10}H_{14}N_4O_3$ M_r 238,25 CAS 603-00-9

Je to (*RS*)-7-(2-hydroxypropyl)-1,3-dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{14}N_4O_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96 %.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2)

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 134 °C až 136 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *proxyfylinu CRL*. Měří se tablety připravené z 0,5 mg až 1 mg látek a 0,3 g *bromidu draselného R*.

C. 1 g se rozpustí v 5 ml *acetanhydridu R* a vaří se 15 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 100 ml směsi objemových dílů *etheru R* a *petroletheru R* (20 + 80). Chladí se nejméně 20 min ve vodě s ledem za občasného protřepávání. Pak se zfiltruje a sraženina se promyje směsí

objemových dílů *etheru R* a *petroletheru R* (20 + 80), překrystalizuje z lihu 96% a vysuší ve vakuu. Krystaly tají *(2.2.14)* při 87 °C až 92 °C.

D. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,25 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo zelený. Ke změně zbarvení indikátoru na modré se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 0,3 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 30) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Roztok se připraví těsně před použitím.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,2 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *theofylinu R* se rozpustí v *methanolu R*, přidá se 0,3 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, ethanolu R* a *chloroformu R* (1 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (400 µg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Z důvodu předejití přehřátí reakčního prostředí se po celou dobu stanovení důkladně míchá a titrace se zastaví okamžitě po dosažení bodu ekvivalence.

0,200 g se rozpustí ve 3,0 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 50,0 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,82 mg $C_{10}H_{14}N_4O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Psyllii semen

Blešníkové semeno

Synonymum. Semen psyllii

Je to zralé celé usušené semeno druhu *Plantago afra* L. (*Plantago psyllium* L.) nebo *Plantago indica* L. (*Plantago arenaria* WALDST. et KIT.).

Vlastnosti

Droga sladké chuti.
Makroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti.

Zkoušky totožnosti

Semena druhu *Plantago afra* jsou světle hnědá až tmavě hnědá, ne však černá, hladká, lesklá, podlouhle oválná, 2 mm až 3 mm dlouhá a 0,8 mm až 1,0 mm široká, na jednom konci širší. Uprostřed dorzální strany je patrná světleji zbarvená skvrna. Na ventrální straně je podélná, světleji zbarvená jizva, lemovaná vystouplými okraji, uprostřed se zřetelně patrným hilem.

Semena *Plantago indica* jsou téměř totožná se semeny druhu *Plantago afra*, jsou však méně lesklá, 2 mm až 3 mm dlouhá a nejvýše 1,5 mm široká.

Zkoušky na čistotu

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 10.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1,0 %, včetně nazelenalých nezralých semen. Stanoví se s 10,0 g drogy.

Droga neobsahuje semena, která mají ve střední části jizvy tmavou skvrnu (*Plantago lanceolata* L. a *Plantago major* L.) nebo semena s hnědavě šedým nebo narůžovělým osemením (*P. ovata* FORSSK. a *P. sempervirens* CRANTZ).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 14,0 %; 1,000 g drogy se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

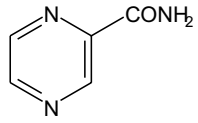
Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 4,0 %.

Uchovávání

Chráněno před světlem a vlhkostí.

† Pyrazinamidum

Pyrazinamid



$C_5H_5N_3O$ M_r 123,11 CAS 98-96-4

Je to 2-pyrazinkarboxamid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_5H_5N_3O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 188 °C až 191 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml (roztok a). 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Měří se absorbance při 290 nm až 350 nm (*2.2.25*); roztok vykazuje absorpční maximum při 310 nm. 2,0 ml roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance při 230 nm až 290 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 268 nm. Specifická absorbance v maximu je 640 až 680.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *pyrazinamidu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *lihu 96% R*, odpaří se do sucha a změří se nová spektra.

D. 0,1 g se rozpustí v 5 ml *vody R*. Přidá se 1 ml *síranu železnatého RS2;* roztok se zbarví oranžově. Přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* roztok se zbarví tmavě modře.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 25 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je červený. Přidá se 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je znovu červený.

Příbuzné látky. Provede se chromatografie na tenké vrstvě (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 50 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *kyseliny nikotinové CRL* se rozpustí ve směsi *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9), přidá se 1 ml zkoušeného roztoku a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 10 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a ihned se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8).* 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

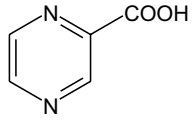
Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 50 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,31 mg $C_5H_5N_3O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Nečistoty

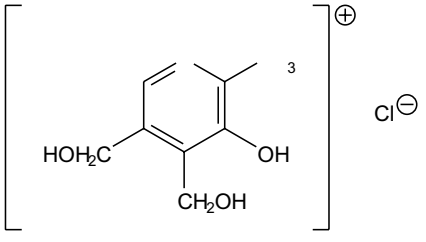


A. kyselina 2-pyrazinkarboxylová.

† Pyridoxini hydrochloridum

Pyridoxiniumchlorid

Synonyma. Pyridoxolium chloratum, Pyridoxinium chloratum, vitamin B_6



$C_8H_{12}ClNO_3$ M_r 205,64 CAS 58-56-0

Je to 3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridiniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{12}ClNO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 205 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí na 50,0 ml *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* (roztok a). 1,0 ml roztoku (a) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* na 100 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 250 nm až 350 nm *(2.2.25)*. Absorpční maximum roztoku je při 288 nm až 296 nm. Specifická absorbance v maximu je 425 až 445. 1,0 ml roztoku (a) se zředí na 100,0 ml roztokem *dihydrogenfosforečnanu draselného 0,025 mol/l + hydrogenfosforečnanu sodného 0,025 mol/l* (*2.2.3*). Tento roztok měřený při 220 nm až 350 nm vykazuje dvě absorpční maxima, při 248 nm až 256 nm a při 320 až 327 nm. Specifické absorbance v maximech jsou v rozmezí 175 až 195 a 345 až 365.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *pyridoxiniumchloridu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než barevný porovnávací roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,4 až 3,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 1,0 g látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,10 g *pyridoxiniumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 µl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, dichlormethanu R, tetrahydrofuranu R* a *acetonu R* (9 + 13 + + 13 + 65) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *uhličitanu sodného R* (50 g/l) ve směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (30 + 70).

Po vysušení v proudu vzduchu se vrstva postříká roztokem *dichlorchinonchlorimidu R* (1 g/l) v *lihu 96% R* a ihned se pozoruje. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Ke skvrnám na startu se nepřihlíží.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 µg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 6 ml *octanu rtuťnatého RS*, přidá se 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do vzniku zeleného zbarvení.

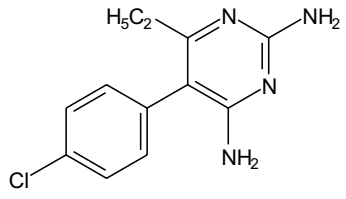
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,56 mg $C_8H_{12}ClNO_3$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Pyrimethaminum

Pyrimethamin



$C_{12}H_{13}ClN_4$ M_r 248,71 CAS 58-14-0

Je to 5-(4-chlorfenyl)-6-ethyl-2,4-pyrimidindiamin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{13}ClN_4$.

Vlastnosti

Téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 239 C až 243 C.

B. 0,14 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku při 250 nm až 300 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 272 nm a absorpční minimum při 261 nm. Specifická absorbance v maximu je 310 až 330.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *pyrimethaminu CRL*.

D. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se 2 min třepe s 50 ml *vody destilované R* a zfiltruje se.

Vzhled roztoku. *Roztok se připraví těsně před použitím.* 0,25 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 3) a zředí se stejnou směsí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu*

sodného 0,01 mol/l VS. Přidá se 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* a 0,05 ml *červeně methylové RS;* roztok je červený nebo oranžový.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R. Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 25 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *pyrimethaminu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 9) na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *1-propanolu R*, *kyseliny octové ledové R* a *toluenu R* (4 + 8 + 12 + 76) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %).

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (80 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku síranů (10 g SO_4 /ml)* a 12,5 ml *vody destilované R.*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí mírným zahřátím v 25 ml *kyseliny octové bezvodé R* a po ochlazení se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,87 mg $C_{12}H_{13}ClN_4$.

Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

Quercus cortex

N

Dubová kůra

Synonymum. Cortex quercus

Je to usušená kůra mladých větví a kmenů druhu *Quercus robur* L. nebo druhu *Quercus petraea* (MATT.) LIEBL. nebo jejich směs. Obsahuje nejméně 3,0 % tříslovin.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Žlábkovitě až rourkovitě svinuté kousky, až 3 mm silné, různě dlouhé. Kůra je na svrchní straně šedohnědá až stříbřitě šedá, hladká, lesklá, někdy s bělavými, příčně protáhlými lenticelami; na vnitřní straně světle hnědá až červenohnědá, hrubě podélně rýhovaná. Lom je tříštivý, hrubě vláknitý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle hnědý až červenohnědý, vláknitý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: svazky lýkových vláken provázených komůrkovými vlákny; bezbarvá, silně ztlustlá vlákna jednotlivě nebo ve skupinách; úlomky korku z buněk plochých, tenkostěnných buněk s nahnědlým až načervenalým obsahem; sklereidy se silně ztlustlými, zdřevnatělými, vrstevnatými stěnami se zřetelně patrnými dvojtečkami, jednotlivě nebo ve skupinách; krystaly a drúzy šťavelanu vápenatého; skupiny vláken s úzkým luminem a žlutými tečkovanými stěnami.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (710) se smíchá s 10 ml *lihu R* 30% (*V/V*) a zahřívá se 30 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 30 mg *taninu R* a 10 mg *kyseliny gallové R* se rozpustí v 10,0 ml *acetonu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní třetině modrá skvrna (tanin) a v horní třetině druhá modrá skvrna (kys. gallová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrozelená skvrna odpovídající polohou skvrně taninu na chromatogramu porovnávacího roztoku; pod ní je další modrá a načervenalá skvrna. V poloze odpovídající skvrně kyseliny gallové na chromatogramu porovnávacího roztoku je modrozelená skvrna a mezi touto skvrnou a čelem chromatogramu je modrá a načervenalá skvrna. V dolní části chromatogramu mohou být další namodralé a nažloutlé skvrny.

D. 0,1 ml zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti C se smíchá se 100 ml *vody R* a s 0,1 ml roztoku *chloridu železitého R* (100 g/l) v *lihu 96% R;* vzniká šedomodré až šedozelené zbarvení.

E. 1 ml zkoušeného roztoku ze Zkoušky totožnosti C se smíchá se 2 ml roztoku *vanilinu R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R;* vznikne červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 5 % částí kůry silnějších než 6 mm.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g práškované drogy (710) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem. Pro přípravu se použije voda prostá oxidu uhličitého R.

0,500 g práškované drogy (710) se v kuželové baňce smíchá se 150 ml *vody R*. Zahřeje se k varu a zahřívá se dalších 30 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje filtračním papírem o průměru 12 cm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Veškeré polyfenoly. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a 17,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (380 g/l). Přesně po 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 750 nm (A_1) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neadsorbovatelné na kožní prášek. K 10,0 ml filtrátu se přidá 0,10 g *kožního prášku CRL* a 60 min se intenzivně protřepává, pak se zfiltruje. 2,0 ml filtrátu se smíchají s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a 17,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (380 g/l). Přesně po 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 750 nm (A_2) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *pyrogallolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a 17,0 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (380 g/l). Přesně 2 min po přidání posledního roztoku a do 15 min po rozpuštění pyrogallolu se měří absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 750 nm (A_3) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{3{,}125 \,.\, (A_1 - A_2)}{A_3 \,.\, m},$$

v němž značí:
m - navážku drogy v gramech.

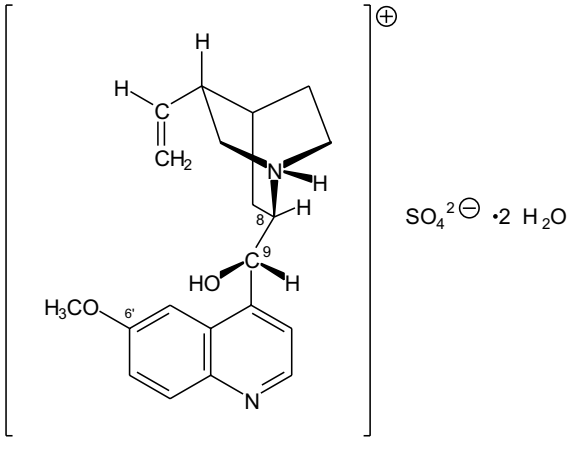
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Quinidini sulfas

Chinidiniumsulfat

Synonyma. Chinidini sulfas, Chinidinium sulfuricum



$C_{40}H_{50}N_4O_8S$. $2H_2O$ M_r 782,95 CAS 6591-63-5

M_r bezvodého 746,92

Je to dihydrát bis[(8*R*,9*S*)-6′-methoxy-9-cinchonanolium]sulfatu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{40}H_{50}N_4O_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo lesklé bezbarvé jehličkovité krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný ve vroucí vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,10 g *chinidiniumsulfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanesou odděleně 4 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *etheru R* a *toluenu R* (10 + 24 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu vzduchu a vyvíjení se opakuje. Pak se vrstva 30 min suší při 105 °C a po ochlazení se postříká *zkoumadlem jodoplatičitým R.* Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *bromové vody RS* a 1 ml *amoniaku zředěného RS2;* vzniká zelené zbarvení.

C. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml; vznikne intenzivně modrá fluorescence, která téměř zmizí po přidání 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R.*

D. Asi 50 mg se rozpustí v 5 ml horké *vody R*, po ochlazení se přidá 1 ml *dusičnanu stříbrného RS1* a promíchá se skleněnou tyčinkou; po několika minutách vznikne bílá sraženina, která se rozpustí po přidání *kyseliny dusičné zředěné RS.*

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.4)*. 6,0 až 6,8; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,10 g zkoušené látky ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +275° až +290°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok S.

Jiné chinové alkaloidy. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *chininiumsulfatu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *chinidiniumsulfatu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). K 1 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (b).
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 10 mg *thiomočoviny R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m až 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm nebo 10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je připravená následujícím způsobem: 6,8 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 3,0 g *hexylaminu R* se rozpustí v 700 ml *vody R*, pH se upraví na 2,8 *kyselinou fosforečnou zředěnou RS*, přidá se 60 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru nastaveného na 250 nm pro záznam chromatogramu porovnávacího roztoku (e) a na 316 nm pro ostatní roztoky.

Postupně se nastříkne po 10 μl porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (e). Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byl kapacitní poměr píku chinidinu 3,5 až 4,5, přičemž se t'_R vypočítá z píku thiomočoviny na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Pak se postupně nastříkne po 10 μl porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je hlavní pík odpovídající chininu a pík odpovídající dihydrochininu, jehož retenční čas vztažený k chininu je asi 1,4. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je hlavní pík odpovídající chinidinu a pík odpovídající dihydrochinidinu, jehož retenční čas vztažený k chininu je asi 1,2. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou 4 píky odpovídající chinidinu, chininu, dihydrochinidinu a dihydrochininu, které se identifikují porovnáním svých

retenčních časů s retenčními časy odpovídajících píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže

- na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) není rozlišení mezi píky chininu a chinidinu menší než 1,5 a rozlišení mezi píky dihydrochinidinu a chininu není menší než 1,0 a
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) není poměr signálu hlavního píku k šumu menší než 5.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a zaznamená se chromatogram po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Pak se vypočte obsah příbuzných látek v procentech z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku normalizovaným postupem, přičemž se neberou v úvahu plochy píků, které jsou menší, než je plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

Obsah dihydrochinidinu není větší než 15 %; obsah žádné příbuzné látky eluované před chinidinem není vyšší než 5 %; obsah žádné jiné příbuzné látky není větší než 2,5 %.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 3,0 % až 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 130 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 20 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,15 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,90 mg $C_{40}H_{50}N_4O_8S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

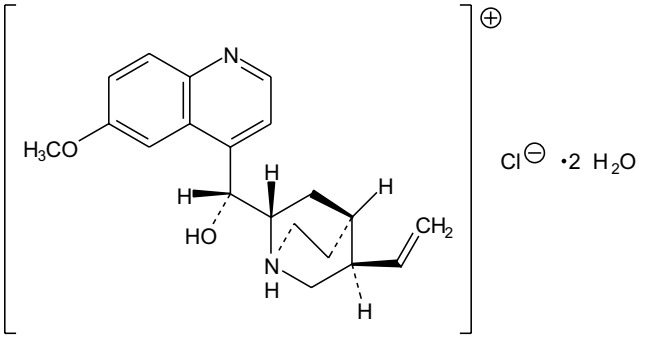
Separandum.

Quinini hydrochloridum

1998

Chininiumchlorid

Synonyma. Chinini hydrochloridum, Chininium chloratum



$C_{20}H_{25}ClN_2O_2 . 2H_2O$ $_r$ 396,91 CAS 6119-47-7

$_r$ bezvodého 360,88

Je to dihydrát (8*S*,9*R*)-6′-methoxy-9-cinchonanoliumchloridu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{25}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Jemné bezbarvé lesklé jehličkovité krystalky, často ve shlucích. Je dobře rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a velmi těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,10 g *chininiumsulfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanesou odděleně 4 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *etheru R* a *toluenu R* (10 + 24 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu vzduchu a vyvíjení se opakuje. Pak se vrstva 30 min suší při 105 °C a po ochlazení se postříká *zkoumadlem jodoplatičitým R.* Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml *bromové vody RS* a 1 ml *amoniaku zředěného RS2;* vzniká zelené zbarvení.

C. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml; vznikne intenzivně modrá fluorescence, která téměř zmizí po přidání 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R.*

D. Vyhovuje zkoušce na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 6,8; měří se roztok připravený zředěním 10 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 20 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -245° až -258°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Jiné chinové alkaloidy. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *chininiumsulfatu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *chinidiniumsulfatu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). K 1 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (b).
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 10 mg *thiomočoviny R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml.

Chromatografický postup se provádí obvykle za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m až 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm nebo 10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je připravená následujícím způsobem: 6,8 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 3,0 g *hexylaminu R* se rozpustí v 700 ml *vody R*, pH se upraví na 2,8 *kyselinou fosforečnou zředěnou RS*, přidá se 60 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru nastaveného na 250 nm pro záznam chromatogramu porovnávacího roztoku (e) a na 316 nm pro ostatní roztoky.

Postupně se nastříkne po 10 μl porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (e). Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byl kapacitní poměr píku chinidinu 3,5 až 4,5, přičemž se t'_R vypočítá z píku thiomočoviny na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Pak se postupně nastříkne po 10 μl porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je hlavní pík odpovídající chininu a pík odpovídající dihydrochininu, jehož retenční čas vztažený k chininu je asi 1,4. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je hlavní pík odpovídající chinidinu a pík odpovídající dihydrochinidinu, jehož retenční čas vztažený k chininu je asi 1,2. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou 4 píky odpovídající chinidinu, chininu, dihydrochinidinu a dihydrochininu, které se identifikují porovnáním svých retenčních časů s retenčními časy odpovídajících píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) není rozlišení mezi píky chininu a chinidinu menší než 3,0 a rozlišení mezi píky dihydrochinidinu a chininu není menší než 2,0 a
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) není poměr signálu hlavního píku k šumu menší než 5.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Pak se vypočte obsah příbuzných látek v procentech z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku normalizovaným postupem, přičemž se neberou v úvahu plochy píků, které jsou menší, než je plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d). Obsah dihydrochininu není vyšší než 10 %; obsah žádné příbuzné látky eluované před chininem není vyšší než 5 % a obsah žádné jiné příbuzné látky není vyšší než 2,5 %.

Sírany *(2.4.13)*. 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g).

Baryum. K 15 ml roztoku S se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Nejméně po 15 min není opalescence roztoku intenzivnější než opalescence směsi 15 ml roztoku S a 1 ml *vody destilované R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 6,0 % až 10,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3000 g se rozpustí ve směsi 50 ml *kyseliny octové bezvodé R*, 20 ml *acetanhydridu R*, přidá se 5 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,04 mg $C_{20}H_{25}ClN_2O_2$.

Uchovávání

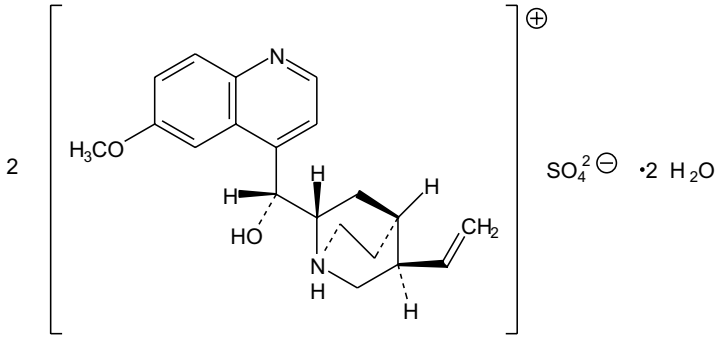
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Quinini sulfas

1998

Chininiumsulfat

Synonymum. Chinini sulfas



$C_{40}H_{50}N_4O_8S$. $2H_2O$ $_r$ 782,95 CAS 6119-70-6

$_r$ bezvodého 746,92

Je to dihydrát bis[(8*S*,9*R*)-6′-methoxy-9-cinchonanolium]sulfatu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{40}H_{50}N_4O_8S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo jemné bezbarvé jehličkovité krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný ve vroucí vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,10 g *chininiumsulfatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanesou odděleně 4 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *etheru R* a *toluenu R* (10 + 24 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu vzduchu a vyvíjení se opakuje. Pak se vrstva 30 min suší při 105 °C a po ochlazení se postříká *zkoumadlem jodoplatičitým R.* Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 0,2 ml *bromové vody RS* a 1 ml *amoniaku zředěného RS2;* vzniká zelené zbarvení.

C. 0,1 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml; vznikne intenzivně modrá fluorescence, která téměř zmizí po přidání 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R.*

D. Asi 45 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,500 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,7 až 6,6; měří se suspenze ve *vodě R* (10 g/l).

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -237° až -245°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Jiné chinové alkaloidy. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *chininiumsulfatu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *chinidiniumsulfatu CRL* se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 5 ml mobilní fáze a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). K 1 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (b).
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 10 mg *thiomočoviny R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10 ml.

Chromatografický postup se provádí obvykle za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,15 m až 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm nebo 10 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je připravená následujícím způsobem: 6,8 g *dihydrogenfosforečnanu draselného R* a 3,0 g *hexylaminu R* se rozpustí v 700 ml *vody R*, pH se upraví na 2,8 *kyselinou fosforečnou zředěnou RS*, přidá se 60 ml *acetonitrilu R* a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
- spektrofotometrického detektoru nastaveného na 250 nm pro záznam chromatogramu porovnávacího roztoku (e) a na 316 nm pro ostatní roztoky.

Postupně se nastříkne po 10 μl porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (e). Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) byl kapacitní poměr píku chinidinu 3,5 až 4,5, přičemž se t'_R vypočítá z píku thiomočoviny na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Pak se postupně nastříkne po 10 μl porovnávacích roztoků (a), (b), (c) a (d). Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je hlavní pík odpovídající chininu a pík odpovídající dihydrochininu, jehož retenční čas vztažený k chininu je asi 1,4. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je hlavní pík odpovídající chinidinu a pík odpovídající dihydrochinidinu, jehož retenční čas vztažený k chininu je asi 1,2. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou 4 píky odpovídající chinidinu, chininu, dihydrochinidinu a dihydrochininu, které se identifikují porovnáním svých retenčních časů s retenčními časy odpovídajících píků na chromatogramech porovnávacích roztoků (a) a (b).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) není rozlišení mezi píky chininu a chinidinu menší než 3,0 a rozlišení mezi píky dihydrochinidinu a chininu není menší než 2,0 a
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) není poměr signálu hlavního píku k šumu menší než 5.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času hlavního píku. Pak se vypočte obsah příbuzných látek v procentech z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku normalizovaným postupem, přičemž se neberou v úvahu plochy píků, které jsou menší, než je plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d). Obsah dihydrochininu není vyšší než 10 %; obsah žádné příbuzné látky eluované před chininem není vyšší než 5 % a obsah žádné jiné příbuzné látky není vyšší než 2,5 %.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 3,0 % až 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3000 g se rozpustí ve směsi 10 ml *chloroformu R* a 20 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,90 mg $C_{40}H_{50}N_4O_8S$.

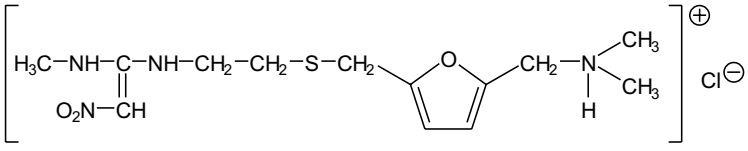
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Ranitidini hydrochloridum

Ranitidiniumchlorid

Synonymum. Ranitidinium chloratum



$C_{13}H_{23}ClN_4O_3S$ $_r$ 350,86 CAS 71130-06-

Je to N,N-dimethyl-N-{5-[2-(1-methylamino-2-nitrovinylamino)-ethylthiomethyl]furfuryl}-amoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{23}ClN_4O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, mírně rozpustný v ethanolu, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 220 nm až 360 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 229 nm a 315 nm. Poměr absorbance zjištěné v maximu při 229 nm k absorbanci zjištěné v maximu při 315 nm je 1,01 až 1,07.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *ranitidiniumchloridu CRL*. Měří se suspenze v *parafinu tekutém R*. Pokud se získaná spektra liší, rozpustí se odděleně 20 mg zkoušené látky a 20 mg referenční látky v 5 ml *methanolu R*, odpaří se ve vodní lázni při 40 °C za sníženého tlaku a stálého míchání do sucha. Zbytky se suší 1 h ve vakuu při 60 °C a zaznamenají se nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *ranitidiniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 3,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 2,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (f). 10 mg *ranitidinu nečistoty A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (g). 10 mg *ranitidinu nečistoty B CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (h). 10 mg *ranitidinu nečistoty B CRL* se rozpustí ve zkoušeném roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, amoniaku 32% R, 2-propanolu R* a *ethylacetatu R* (2 + 4 + 15 + 25) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a vystaví se působení par jodu do objevení se zřetelných skvrn a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající ranitidinu nečistotě A není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (0,5 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající ranitidinu nečistotě A, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %) a nejvýše tři takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,1 %) a nejvýše jedna z těchto skvrn je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (h) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny odpovídající ranitidinu nečistotě B (R_F se získá porovnáním s chromatogramem porovnávacího roztoku (g)) a ranitidinu a pokud na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) je zřetelně viditelná skvrna.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,75 %; 1,000 g se suší za vysokého vakua při 60 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,280 g se rozpustí ve 35 ml *vody R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,09 mg $C_{13}H_{23}ClN_4O_3S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. N,N′-bis{2-[5-(dimethylaminomethyl)furan-2-yl]methylthioethyl}-2-nitroethen-1,1-diamin,
B. {[5-(2-aminoethylthiomethyl)furan-2-yl]methyl}dimethylamin,
C. N-{2-[5-(dimethylaminomethyl)furan-2-yl]methylsulfinylethyl}-N′-methyl-2-nitroethen-1,1-diamin,
D. N-{2-[5-(dimethylaminomethyl)furan-2-yl]methylthioethyl}-2-nitroacetamid,
E. N-oxid N-{2-[5-(dimethylaminomethyl)furan-2-yl]methylthioethyl}-N′-methyl-2-nitroethen-1,1--diaminu,
F. [5-(dimethylaminomethyl)furan-2-yl]methanol,
G. oxim 3-(methylamino)-5,6-dihydro-2*H*-1,4-thiazin-2-onu,
H. N-methyl-2-nitroacetamid.

Ratanhiae radix

Ratanhový kořen

Synonymum. Radix ratanhiae

Je to usušený celý kořen druhu *Krameria triandra* RUIZ et PAV. nebo jeho úlomky. Obsahuje nejméně 10,0 % tříslovin.

Vlastnosti

Droga bez pachu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kořen tmavě červenohnědý, má silnou uzlovitou hlavu. Sekundární kořeny mají stejnou barvu a jsou téměř rovné nebo jen mírně zkroucené. Kůra starých kořenů je šupinovitě rozpukaná, u mladých kořenů hladká s ostrými příčnými prasklinami; snadno se odděluje od dřeva. Lom je v kůře vláknitý, v dřevu tříštivý. Na hladkém příčném řezu je patrna tmavě hnědočervená kůra, která sahá do jedné třetiny průměru kořene, a husté, světle červenohnědé, jemně pórovité dřevo s četnými, jemnými dřeňovými paprsky. Centrální jádrové dřevo je často tmavší.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědočervený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: korkové buňky obsahující tmavě hnědé flobafeny; úlomky nezdřevnatělých lýkových vláken v průměru zpravidla 12 μm až 30 μm, s mírně ztlustlými stěnami; parenchymatické buňky lýka uspořádané v řadách obsahují hranolky a mikrokrystaly šťavelanu vápenatého; úlomky cév obvykle v průměru 20 μm až 60 μm s dvůrkovitými ztenčeninami; úlomky cévic až 20 μm v průměru se štěrbinovitými ztenčeninami.

Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% (*V/V*); jsou patrná okrouhlá škrobová zrna, jednotlivá nebo shloučená po dvou až čtyřech. Jednotlivá zrna mají až 30 μm v průměru. Škrobová zrna se nacházejí ojediněle v buňkách dřeňových paprsků a v parenchymu.

C. 0,1 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *vody R* a po 1 h stání se roztok zfiltruje. K filtrátu se přidají 2 ml roztoku *síranu amonno-železnatého R* (100 g/l). Tekutina se kalí, vzniká tmavošedé zbarvení. Po usazení je roztok nad usazeninou šedozelený.

D. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 5 ml *lihu 96% R* a nechá se stát 2 h za častého protřepávání, pak se zfiltruje. 1 ml hnědočerveného filtrátu se zředí *lihem 96% R* na 100 ml. Přidá se 0,1 ml roztoku *chloridu železitého R* (100 g/l) v *lihu 96% R* a protřepe se; vznikne zelené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2,0 % a nejvýše 5,0 % úlomků kořenových hlav nebo kořenů, jejichž průměr je větší než 25 mm. Kořeny zbavené kůry mohou být přítomny pouze ojediněle.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 5,5 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

Pro přípravu roztoků se používá voda prostá oxidu uhličitého R.

0,750 g práškované drogy (180) se v kuželové baňce smíchá se 150 ml *vody R*. Zahřeje se k varu a zahřívá se dalších 30 min ve vodní lázni. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede kvantitativně do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje filtračním papírem o průměru 12 cm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Polyfenoly celkově. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a zředí se roztokem *uhličitanu sodného R* (150 g/l) na 50,0 ml. Přesně 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_1) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neadsorbované na kožním prášku. K 10,0 ml filtrátu se přidá 0,10 g *kožního prášku CRL* a 60 min se intenzivně protřepává, pak se zfiltruje. 5,0 ml filtrátu se zředí *vodou R* na 25,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a zředí se roztokem *uhličitanu sodného R* (150 g/l) na 50,0 ml. Přesně 2 min po přidání posledního roztoku se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_2) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Porovnávací roztok. 50,0 mg *pyrogallolu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá s 1,0 ml *kyseliny fosfowolframové RS* a zředí se roztokem *uhličitanu sodného R* (150 g/l) na 50,0 ml. Přesně 2 min po přidání posledního roztoku a do 15 min po rozpuštění pyrogallolu se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při 715 nm (A_3) za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{13{,}12 \,.\, (A_1 - A_2)}{A_3 \,.\, m},$$

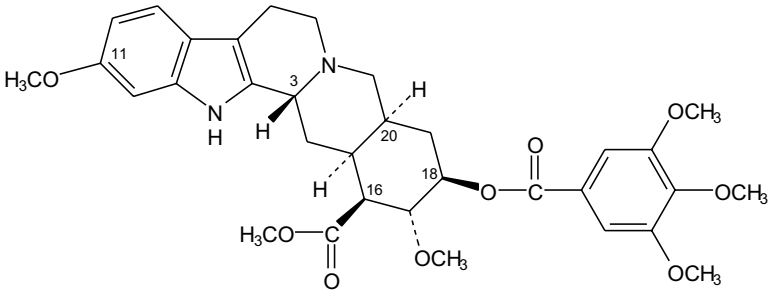
v němž značí:
m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

†† Reserpinum

Reserpin



$C_{33}H_{40}N_2O_9$ $_r$ 608,69 CAS 50-55-5

Je to methyl-[11,17α-dimethoxy-18β-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-3β,20α-yohimban-16β-karboxylat]. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % celkových alkaloidů a 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{33}H_{40}N_2O_9$.

Vlastnosti

Krystalický prášek nebo malé bílé až slabě žluté krystalky, na světle pomalu tmavnoucí. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v etheru, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) ihned po přípravě roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 268 nm. Specifická absorbance v maximu je 265 až 285. V rozmezí 288 nm až 295 nm křivka vykazuje málo výrazné absorpční minimum, na které navazuje prodleva nebo slabé absorpční maximum. V tomto rozmezí je specifická absorbance asi 170.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *reserpinu CRL*.

C. K asi 1 mg se přidá 0,1 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (1 g/l) v *kyselině sírové R;* vznikne žluté zbarvení, které se během 2 min změní na modré.

D. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml čerstvě připraveného roztoku *vanilinu R* (10 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R;* během 2 min vznikne růžové zbarvení.

E. Asi 0,5 mg se smíchá s 5 mg *dimethylaminobenzaldehydu R* a 0,2 ml *kyseliny octové ledové R* a přidá se 0,2 ml *kyseliny sírové R;* vznikne zelené zbarvení, které se po přidání 1 ml *kyseliny octové ledové R* změní na červené.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -116° až -128°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok ihned po jeho přípravě, připravený rozpuštěním 0,250 g v *chloroformu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Oxidační produkty. 20 mg se rozpustí v *kyselině octové ledové R* a zředí se jí na 100,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená ihned po jeho přípravě v maximu při 388 nm není větší než 0,10.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší 3 h nad *oxidem fosforečným R* při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 667 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 0,50 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Celkové alkaloidy. 0,500 g se rozpustí ve směsi 6 ml *acetanhydridu R* a 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 60,9 mg celkových alkaloidů.

Reserpin. *Zkouška se provede za chránění před světlem.* 25,0 mg se smíchá s 2 ml *lihu 96% R,* přidají se 2 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS* a 10 ml *lihu 96% R.* Roztok se mírně zahřeje, po rozpuštění se ochladí a zředí se *lihem 96% R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml (zkoušený roztok). Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 25,0 mg *reserpinu CRL.* K 10,0 ml každého roztoku se odděleně do dvou odměrných baněk přidají 2,0 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l VS* a 2,0 ml čerstvě připraveného roztoku *dusitanu sodného R* (3 g/l) promíchá se a 35 min se zahřívá ve vodní lázni při 55 °C. Po ochlazení se přidá 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *kyseliny amidosírové R* (50 g/l) a zředí se *lihem 96% R* na 25,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při 388 nm proti kontrolnímu roztoku, kterým je roztok připravený současně stejným způsobem s 10,0 ml zkoušeného roztoku bez přidání dusitanu sodného.

Obsah $C_{33}H_{40}N_2O_9$ se vypočítá pomocí naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

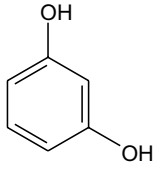
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Venenum.

† Resorcinolum

Resorcinol

Synonymum. Resorcinum



$C_6H_6O_2$ $_r$ 110,11 CAS 108-46-3

Je to benzen-1,3-diol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_6O_2$.

Vlastnosti

Bezbarvý nebo slabě růžovošedý krystalický prášek nebo krystalky na světle a vzduchu červenající. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%, snadno rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 109 °C až 112 °C.

B. 0,1 g se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS,* 0,1 ml *chloroformu R*, zahřeje se a nechá se vychladnout; vzniká intenzivní tmavě červené zbarvení, které se změní na slabě žluté přidáním malého přebytku *kyseliny chlorovodíkové R.*

C. Asi 10 mg se důkladně promíchá s 10 mg *hydrogenftalanu draselného R*, obě látky se předem jemně upráškují. Směs se zahřívá nad otevřeným plamenem do oranžově žlutého zbarvení a ochladí se. Přidá se 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R* a protřepává se do rozpuštění; roztok intenzivně zeleně fluoreskuje.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_5 nebo $Č_5$ *(2.2.2, Metoda II)* a zbarvení se nemění, je-li roztok zahříván 5 min ve vodní lázni.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *modři bromfenolové RS2*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *hexanu R* (40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min na vzduchu a vystaví se parám jodu. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Pyrokatechol. Ke 2 ml roztoku S se přidá 1 ml *molybdenanu hexaamonného RS2* a promíchá se; žluté zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 2 ml roztoku *pyrokatecholu R* (0,1 g/l).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g upráškované zkoušené látky se suší 4 h v exsikátoru.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 250,0 ml. Ke 25,0 ml tohoto roztoku se v baňce se zábrusovou zátkou přidá 1,0 g *bromidu draselného R*, 50,0 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS*, 15,0 ml *chloroformu R* a 15,0 ml *kyseliny chlorovodíkové RS1*. Baňka se uzavře, obsah se protřepe a nechá se 15 min stát ve tmě za občasného protřepání. Pak se přidá 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (100 g/l), důkladně se protřepe, nechá se 5 min stát a titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* odpovídá 1,835 mg $C_6H_6O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Rhamni purshianae cortex

1998

Kůra řešetláku Purshova

Synonymum. Cortex rhamni purshianae

Je to usušená kůra nebo její úlomky druhu *Rhamnus purshianus* D.C. (*Frangula purshiana* (D.C.) A. GRAY ex J.C. COOPER).

Obsahuje nejméně 8,0 % hydroxyanthracenových glykosidů, z toho nejméně 60 % kaskarosidů, obojí počítáno jako kaskarosid A ($C_{27}H_{32}O_{14}$; M_r 580,5), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Jsou to mírně žlábkovité nebo téměř ploché úlomky, obvykle 1 mm až 5 mm silné, velmi proměnlivé délky a šířky. Zevní strana šedá nebo temně šedohnědá, někdy s roztroušenými, příčně protáhlými lenticelami. Obvykle je pokryta více nebo méně souvislou bělavou vrstvou lišejníků, epifytických mechů a lupenitých játrovek. Vnitřní strana je žlutá až červenohnědá nebo téměř černá s jemným podélným rýhováním. Alkalickými roztoky se barví červeně. Lom krátký, žlutý, v zevní části zrnitý, ve vnitřní části mírně vláknitý.

B. Droga se upráškuje (355), prášek je žlutohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: svazky částečně zdřevnatělých lýkových vláken provázených komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého; skupiny sklereid provázených vrstvami krystalů; drúzy šťavelanu vápenatého; některé parenchymatické buňky jsou vyplněny žlutou hmotou, která se alkalickými roztoky barví tmavě červeně; buňky korku; často i epifyty, např. játrovky celé nebo jejich úlomky, s čepelí bez střední žilky tvořenou jednou vrstvou izodiametrických buněk nebo listy mechů s čepelí tvořenou jednou vrstvou protáhlých buněk a se střední vícebuněčnou žilkou.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Jiné druhy rodu Rhamnus; anthrony, viz Zkoušky na čistotu, po postříkání roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) a následném zahřátí.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik červenohnědých skvrn s rozdílnou intenzitou zbarvení. Čtyři skvrny jsou slabě zbarvené, tři z nich jsou ve střední části chromatogramu a jedna v dolní třetině, v horní třetině chromatogramu je intenzivně zbarvená skvrna. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je několik skvrn vykazujících stejnou fluorescenci nad a zejména pod (kascarosidy) skvrnou odpovídající aloinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. 0,2 g práškované drogy (180) se 15 min zahřívá s 50 ml *vody R* na vodní lázni. Po ochlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 20 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zahřívá se 15 min na vodní lázni. Po ochlazení se převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 20 ml *etheru R*. Vodná vrstva se uschová (roztok A).

a) Spojené etherové výtřepky se protřepávají 10 ml *amoniaku zředěného RS2;* vodná vrstva se zbarví červenofialově.

b) Roztok A se v malé baňce smíchá s 5 g *chloridu železitého R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se převede do dělicí nálevky a protřepe se 15 ml *etheru R*. Etherová vrstva se promyje 10 ml *vody R*, vodná vrstva se odstraní. Etherová vrstva se protřepe 5 ml *amoniaku zředěného RS2*. Vodná vrstva se zbarví červeně.

Zkoušky na čistotu

Jiné druhy rodu *Rhamnus;* anthrony. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. K 0,5 g práškované drogy (180) se přidá 5 ml *lihu R* 70% (*V/V*) a zahřeje se k varu. Po ochlazení se odstředí. Supernatantní kapalina se okamžitě dekantuje a použije se do 3 min.
Porovnávací roztok. 20 mg *aloinu R* se rozpustí v *lihu R* 70% (*V/V*) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (13 + 17 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 5 min na vzduchu, pak se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Chromatogramy se hodnotí ihned po zahřívání. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části červenohnědá skvrna odpovídající aloinu. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna odpovídající aloinu fluoreskuje intenzivně žlutohnědě. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není mezi skvrnou aloinu a skvrnami kaskarosidů žádná skvrna fluoreskující oranžově hnědě.

Na další vrstvu se nanese do pruhu 10 μl zkoušeného roztoku a dále se postupuje výše uvedeným způsobem. Vrstva se suší nejvýše 5 min,pak se okamžitě postříká roztokem *modři nitrotetrazo-*

liové R (5 g/l) v *methanolu R* a chromatogram se ihned hodnotí. Na chromatogramu nejsou žádné fialové nebo šedomodré skvrny.

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (180) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 7,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede během jednoho dne a za ochrany před světlem.

1,00 g práškované drogy (180) se převede do 100 ml vroucí *vody R* a za stálého míchání se 5 min vaří. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100,0 ml, důkladně se protřepe, zfiltruje se a prvních 20 ml filtrátu se odstraní. 10,0 ml filtrátu se převede do dělicí nálevky, přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a protřepává se dvakrát 20 ml směsi objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (1 + 3). Spojené organické vrstvy se promyjí 5 ml *vody R*, organická vrstva se odstraní a promývací tekutina se přidá k vodné vrstvě. Spojené vodné vrstvy se protřepávají čtyřikrát 30 ml *ethylacetatu R* čerstvě nasyceného *vodou R* (ke 150 ml *ethylacetatu R* se přidá 15 ml *vody R*, 3 min se třepe a nechá se stát); oddělené vrstvy jsou vždy čiré. Ethylacetatové vrstvy se spojí.

Vodná vrstva se použije pro stanovení obsahu kaskarosidů, organická vrstva se použije pro stanovení obsahu dalších hydroxyanthracenových glykosidů jiných než kaskarosidů.

Hydroxyanthracenové glykosidy jiné než kaskarosidy. Organická vrstva se převede do vhodné baňky a rozpouštědlo se oddestiluje téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,3 ml až 0,5 ml *methanolu R* a převede se do odměrné baňky. Varná baňka se promyje horkou *vodou R* a promývací tekutina se spojí s methanolickým roztokem. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 20,0 ml roztoku se ve 100ml baňce s kulatým dnem a se zábrusovou zátkou smíchá s 2 g *chloridu železitého R* a 12 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Zahřívá se 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Po ochlazení se roztok převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 3 ml až 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 3 ml až 4 ml *vody R;* promývací tekutiny se spojí s roztokem v dělicí nálevce. Obsah dělicí nálevky se protřepe třikrát 30 ml směsi objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (1 + 3). Spojené organické vrstvy se promyjí dvakrát 10 ml *vody R*, vodná vrstva se odstraní. Organická vrstva se zředí směsí objemových dílů *etheru R* a *hexanu R* (1 + 3) na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se odpaří opatrně na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R* a změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah kaskarosidu A v procentech podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 6{,}95}{m} \ ,$$

v němž značí:

A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,

m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance kaskarosidu A, počítaná na základě specifické absorbance aloinu, je 180.

Změří se absorbance zkoušeného roztoku při 440 nm. Zkoušku je nutno opakovat, jestliže poměr absorbance při 515 nm k absorbanci při 440 nm je menší než 2,4.

Kaskarosidy. Vodná vrstva uchovaná pro tuto zkoušku se zředí *vodou R* na 50,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se zpracuje výše uvedeným postupem.

Obsah hydroxyanthracenových glykosidů, vyjádřeno jako kaskarosid A, v procentech se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A \,.\, 6{,}95}{m},$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,
m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance kaskarosidu A, počítaná na základě specifické absorbance aloinu, je 180.

Změří se absorbance zkoušeného roztoku při 440 nm. Zkoušku je nutno opakovat, jestliže poměr absorbance při 515 nm k absorbanci při 440 nm je menší než 2,7.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Rhei radix

Reveňový kořen

Synonymum. Radix rhei

Jsou to usušené celé nebo řezané kořeny a oddenky druhu *Rheum palmatum* L., *Rheum officinale* BAILL., kříženců obou druhů nebo jejich směs. Podzemní části jsou většinou rozřezané, zbavené stonku a zevní vrstvy kůry s postranními kořínky.

Obsahuje nejméně 2,2 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako rhein ($C_{15}H_8O_6$; M_r 284,2), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga charakteristického, aromatického pachu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Droga má různý vzhled; okrouhlé plátky v průměru až 10 cm, 1 cm až 5 cm silné; kuželovité, oválné nebo ploskovypouklé kousky. Svrchní strana má bledě růžový nádech, je obvykle pokryta vrstvou hnědožlutého prášku. Tmavší, síťovitě se křížící linie jsou patrné zejména po navlhčení; vytvářejí charakteristický, mramorovaný vzhled drogy. Lom je zrnitý. Na příčném řezu je patrná úzká zevní vrstva s paprsčitými, hnědočervenými pruhy. Dřeňové paprsky kolmo protínají tmavý pruh kambia. Uprostřed je pruh drobných, hvězdicovitě uspořádaných anomálních svazků cévních. Kořen má výrazně paprsčitou strukturu.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je oranžový až hnědožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Prášek vykazuje následující charakteristické znaky: velké drúzy šťavelanu vápenatého, někdy o průměru více než 100 μm, a jejich úlomky; síťovitě ztlustlé, nezdřevnatělé cévy o průměru až 175 μm. Četné skupiny okrouhlých nebo mnohohranných, tenkostěnných parenchymatických buněk. Sklereidy a průvodní vlákna chybí.

Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% (*V/V*). Jsou patrna okrouhlá škrobová zrna s hvězdovitou trhlinou, jednotlivá nebo složená po dvou až čtyřech.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 50 mg práškované drogy (180) se smíchá s 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 30 ml *vody R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 25 ml *etheru R*. Etherová vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v 0,5 ml *etheru R*.
Porovnávací roztok. 5 mg *emodinu R* se rozpustí v 5 ml *etheru R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, ethylacetatu R* a *etheru petrolejového R* (1 + 25 + 75) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části oranžově fluoreskující skvrna (emodin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Nad skvrnou emodinu jsou dvě oranžově fluoreskující skvrny (v pořadí vzestupné hodnoty R_F - fyscion, chrysofanol) a pod skvrnou emodinu jsou další dvě oranžově fluoreskující skvrny (v pořadí sestupné hodnoty R_F - rhein, aloeemodin). Vrstva se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R*. Všechny skvrny se zbarví červeně až fialově.

D. Asi 50 mg práškované drogy (180) se smíchá s 25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zahřívá se 15 min na vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 20 ml *etheru R,* vodná vrstva se odstraní. Etherová vrstva se protřepe 10 ml *amoniaku zředěného RS1*. Vodná vrstva se zbarví červeně až fialově.

Zkoušky na čistotu

Rheum rhaponticum. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g práškované drogy (180) se smíchá s 2 ml *methanolu R* a vaří se 5 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje. Filtrát se použije jako zkoušený roztok.
Porovnávací roztok. 10 mg *rhaponticinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (nejvýše 20 mm x 3 mm) po 20 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (20 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se postříká *kyselinou fosfomolybdenovou RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není v blízkosti startu modrá skvrna (rhaponticin) odpovídající polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Cizí příměsi *(2.8.2).* Vyhovuje požadavkům zkoušky Cizí příměsi.

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (180) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové *(2.8.1).* Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

0,100 g práškované drogy (180) se ve 100ml baňce smíchá s 30,0 ml *vody R*, baňka se zváží a směs se zahřívá 15 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Po ochlazení se přidá 50 mg *hydrogenuhličitanu sodného R*, zváží se, doplní se *vodou R* na původní hmotnost a roztok se odstředí. 10,0 ml čirého roztoku se převede do 100ml baňky se zábrusovou zátkou, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a směs se zahřívá 20 min na vodní lázni pod zpětným chladičem. Pak se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se dalších 20 min za častého protřepávání. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepává se třikrát 25 ml *etheru R*, kterým byla předem promyta baňka. Spojené etherové výtřepky se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*. Etherová vrstva se zfiltruje chomáčkem vaty do odměrné baňky a doplní se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha, zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*. Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako rhein, podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 0{,}64}{m} ,$$

v němž značí:

A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,

m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance rheinu, počítaná na základě specifické absorbance aloinu, je 468.

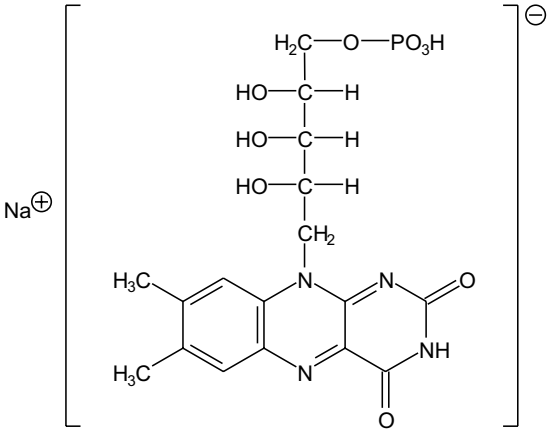
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Riboflavini natrii phosphas

1998

Sodná sůl riboflavinfosfatu



$C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$ M_r 478,33 CAS 130-40-5

Je to směs obsahující sodnou sůl riboflavin-5′-hydrogenfosfatu jako hlavní složku a jiné sodné soli riboflavinmonofosfatů. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 73,0 % až 79,0 % sloučeniny $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (M_r 376,37). Obsahuje proměnné množství vody.

Vlastnosti

Žlutý nebo oranžově žlutý krystalický hygroskopický prášek. Je dobře rozpustná ve vodě, velmi těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 50,0 mg se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,0* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,0* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 266 nm. Specifická absorbance v maximu je 580 až 640.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a přibližnou velikostí shoduje s hlavním píkem na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

C. Asi 10 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném zředěném RS* a zředí se jím na 100 ml. 1 ml roztoku se vystaví působení ultrafialového světla při 254 nm na dobu 5 min, okyselí se na *papír lakmusový modrý R* dostatečným množstvím *kyseliny octové R* a třepe se s 2 ml *dichlormethanu R;* spodní vrstva vykazuje žlutou fluorescenci.

D. K 0,5 g se přidá 10 ml *kyseliny dusičné R*, směs se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se žíhá až do odstranění uhlíku. Pak se zbytek rozpustí v 5 ml *vody R* a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje zkoušce (a) na sodík a zkoušce (b) na fosforečnany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +38,0° až +43,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,300 g v 18,2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zředěním *vodou R* na 25,0 ml.

Lumiflavin. K asi 35 mg se přidá 10 ml *dichlormethanu R*, 5 min se protřepává a zfiltruje se. Filtrát není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29). Zkouška se provede za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v 50 ml *vody R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml. 8,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 60,0 mg *riboflavinu CRL* se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. 4,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,100 g *sodné soli riboflavinfosfatu CRL* se rozpustí v 50 ml *vody R* a zředí se mobilní fází na 100,0 ml. 8,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *methanolu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (7,35 g/l) (150 + 850), s průtokovou rychlostí 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 266 nm.

Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek je retenční čas riboflavin-5′-monofosfatu asi 20 min a relativní retenční časy látek jsou:
- riboflavin-3′,4′-difosfatu asi 0,2,
- riboflavin-3′,5′-difosfatu asi 0,3,
- riboflavin-4′,5′-difosfatu asi 0,5,
- riboflavin-3′-monofosfatu asi 0,7,
- riboflavin-4′-monofosfatu asi 0,9,
- riboflavin-5′-monofosfatu 1,0,
- riboflavinu asi 2,0.

Nastříkne se 100 ml porovnávacího roztoku (a). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

Nastříkne se 100 μl porovnávacího roztoku (b). Chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojnásoku retenčního času riboflavinu-5′-monofosfatu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími riboflavinu-4′-monofosfatu a riboflavinu-5′-monofosfatu je nejméně 1,5.

Nastříkne se 100 μl zkoušeného roztoku a 100 μl porovnávacího roztoku (a) a 100 μl porovnávacího roztoku (b). Vypočítá se procentuální obsah volného riboflavinu a obsah riboflavinu ve formě difosfatu z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a z množství volného riboflavinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Obsah volného riboflavinu není větší než 6,0 % a obsah riboflavinu ve formě difosfatu není větší než 6,0 %, obojí počítáno na vysušenou látku.

Anorganické fosforečnany. 0,10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *vody R*, 5 ml *tlumivého roztoku se síranem měďnatým o pH 4,0*, 2 ml roztoku

molybdenanu hexamonného R (30 g/l), 1 ml čerstvě připraveného roztoku obsahujícího roztok *metolu R* (20 g/l) a roztok *disiřičitanu sodného R* (50 g/l) a 1 ml roztoku *kyseliny chloristé R* 3% (*V/V*). Zředí se *vodou R* na 25,0 ml a měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) do 15 min od jeho přípravy při 800 nm za použití kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce. Absorbance tohoto roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného takto: k 15 ml základního *roztoku fosforečnanů (5 g PO_4/ml)* se přidá 5 ml *tlumivého roztoku se síranem měďnatým o pH 4,0*, 2 ml roztoku *molybdenanu hexamonného R* (30 g/l), 1 ml čerstvě připraveného roztoku obsahujícího roztok *metolu R* (20 g/l) a roztok *disiřičitanu sodného R* (50 g/l) a 1 ml roztoku *kyseliny chloristé R* 3% (*V/V*). Zředí se *vodou R* na 25,0 ml (1,5 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). Ke 2,0 g se v křemenném kelímku po kapkách přidají 2 ml *kyseliny dusičné R* a 0,25 ml *kyseliny sírové R*. Opatrně se zahřívá do vzniku bílých par a vyžíhá se. Ochlazený zbytek se extrahuje dvakrát po 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a spojené extrakty se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 10 ml základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 8,0 %; 1,000 g se suší 5 h v sušárně při 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede za chránění před světlem. 0,100 g se rozpustí ve 150 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. K 10,0 ml se přidá 3,5 ml roztoku *octanu sodného R* (14 g/l) a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 444 nm.

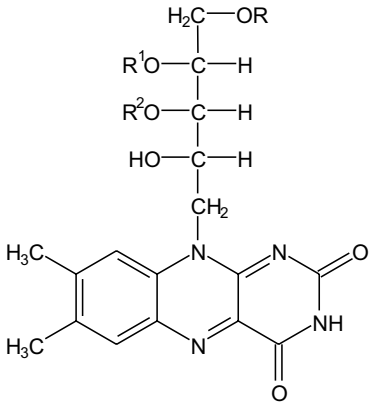
Obsah $C_{17}H_{20}N_4O_6$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 328.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

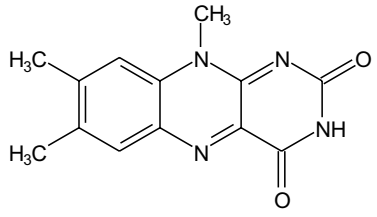
Separandum.

Nečistoty



A. R = H; $R^1 = R^2 = PO_3H_2$: riboflavin-3′,4′-bis(dihydrogenfosfat),

B. R^1 = H; R = R^2 = PO_3H_2: riboflavin-3′,5′-bis(dihydrogenfosfat),
C. R^2 = H; R = R^1 = PO_3H_2: riboflavin-4′,5′-bis(dihydrogenfosfat),
D. R = R^1 = R^2 = H: riboflavin,

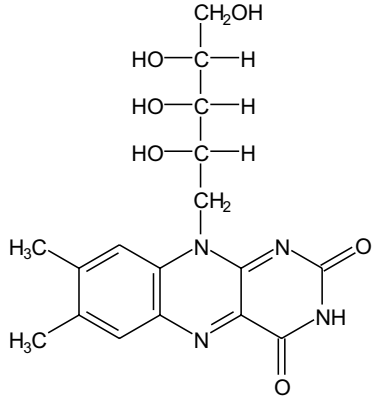


E. lumiflavin.

† Riboflavinum

Riboflavin

Synonymum. Vitamin B_2



$C_{17}H_{20}N_4O_6$ $_r$ 376,37 CAS 83-88-5

Je to 7,8-dimethyl-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]-3*H*,10*H*-benzopteridin-2,4-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{20}N_4O_6$.

Vlastnosti

Žlutý nebo oranžově žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru. Je rozpustnější v roztoku chloridu sodného (9 g/l) než ve vodě. Roztoky se rozkládají působením světla, zvláště v přítomnosti alkálií.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *riboflavinu CRL.*

C. 1 mg se rozpustí ve 100 ml *vody R.* Roztok vykazuje v procházejícím světle slabě zelenožluté zbarvení a v odraženém světle intenzivní žlutozelenou fluorescenci, která mizí po přidání minerálních kyselin nebo alkálií.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 0,5 g se přidá 25 ml *vody R*, 2 min se vaří a po chlazení se zfiltruje. K 10 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a 0,4 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je oranžový. Přidá se 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Přidá se 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok je oranžový.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -115° až -135°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok do 30 min po přípravě připravený takto: 50,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,05 mol/l RS* prostém uhličitanů a zředí se stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Absorbance (*2.2.25*). Konečný roztok získaný ve zkoušce Stanovení obsahu se zředí stejným objemovým dílem *vody R.* Roztok vykazuje čtyři maxima, při 223 nm, 267 nm, 373 nm, 444 nm. Poměr absorbance zjištěné v maximu při 373 nm k absorbanci zjištěné při 267 nm je 0,31 až 0,33 a poměr absorbance zjištěné v maximu při 444 nm k absorbanci zjištěné při 267 nm je 0,36 až 0,39.

Lumiflavin. K 25 mg se přidá 10 ml *chloroformu R*, 5 min se protřepává a zfiltruje se. Filtrát není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se se zbytkem získaným ve zkoušce Ztráta sušením.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede za chránění před světlem. 65,0 mg se suspenduje v 500ml hnědé odměrné baňce v 5 ml *vody R* tak, aby látka byla úplně smáčena, a rozpustí se v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS.* Po úplném rozpuštění se přidá 100 ml *vody R*, 2,5 ml *kyseliny octové ledové R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml. K 20,0 ml tohoto roztoku se v 200ml hnědé odměrné baňce přidá 3,5 ml roztoku *octanu sodného R* (14 g/l) a zředí se *vodou R* na 200,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 444 nm.

Obsah $C_{17}H_{20}N_4O_6$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 328.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Ricini oleum

Ricinový olej

Synonymum. Oleum ricini

CAS 8001-79-4

Je to hustý olej získaný lisováním za studena ze semen druhu *Ricinus communis* L.

Vlastnosti

Čirá téměř bezbarvá nebo slabě žlutá viskózní kapalina, chuti zpočátku jemné, později štiplavé. Je dobře rozpustný v etheru, těžce rozpustný v etheru petrolejovém, mísitelný s lihem 96% a s kyselinou octovou ledovou.

Zkoušky na čistotu

Index lomu *(2.2.6)*. 1,477 až 1,481.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 0,952 až 0,965.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. +3,5° až +6,0°.

Absorbance *(2.2.25)*. 1,0 g se smíchá s *lihem 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. Roztok vykazuje maximum při (269 ± 1) nm. Specifická absorbance v maximu je nejvýše 1,0.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; 5,00 g se rozpustí v 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Číslo hydroxylové *(2.5.3, Metoda A)*. Nejméně 150,0.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 82 až 90.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění *(2.5.6)*. 176 až 187, stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Nezmýdelnitelné látky *(2.5.7)*. Nejvýše 0,8 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Cizí tuky.

a) 2 ml se smíchají s 8 ml *lihu 96% R*. Roztok je čirý *(2.2.1)*.
b) 10,0 ml se protřepe s 20,0 ml *etheru petrolejového R*. Spodní vrstva má po oddělení objem nejméně 16,0 ml.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Jestliže je látka určena k výrobě parenterálních přípravků, nejvýše 0,3 %, stanoví se s 3,000 g zkoušené látky.

Uchovávání

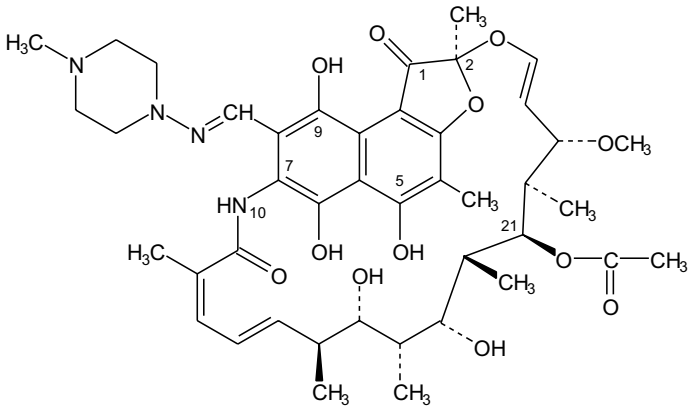
V dobře uzavřených, zcela naplněných obalech, chráněn před světlem, v chladu.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název a množství případně přidaného antioxidantu,
- zda je látka vhodná k výrobě parenterálních přípravků.

† Rifampicinum

Rifampicin



$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ $_r$ 822,95 CAS 13292-46-1

Je to (12*Z*,14*E*,24*E*)-(2*S*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*)-5,6,9,17,19-pentahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-8-[N-(4-methyl-1-piperazinyl)formimidoyl]-1,11-dioxo-2,7-[epoxy(1,11,13-pentadekatrien)imino]-1,2-dihydronafto[2,1-*b*]furan-21-yl-acetat, polosyntetické antibiotikum, získané z rifamycinu SV. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$.

Vlastnosti

Červenohnědý nebo hnědočervený krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v acetonu, v etheru a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. 50 mg se rozpustí v 50 ml *methanolu R*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,4* na 50 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 220 nm až 500 nm (*2.2.25*); roztok vykazuje čtyři absorpční maxima, při 237 nm, 254 nm, 334 nm a 475 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 334 nm k absorbanci naměřené v maximu při 475 nm je asi 1,75.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *rifampicinu CRL*. Zkouší se jako pasta v *parafinu tekutém R*.

C. 25 mg se suspenduje v 25 ml *vody R*, 5 min se protřepává a zfiltruje. K 5 ml filtrátu se přidá 1 ml roztoku *peroxodisíranu diamonného R* (100 g/l) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,4* a několik minut se třepe. Zbarvení roztoku se mění z oranžově žlutého na fialově červené a netvoří se žádná sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,5. Měří se suspenze (10 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R.*

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Směs rozpouštědel. Smíchají se objemové díly roztoku *kyseliny citronové R* (210,1 g/l), roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (136,1 g/l), roztoku *hydrogenfosforečnanu draselného R* (174,2 g/l), *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 23 + 77 + 250 + 640).

Zkoušený a porovnávací roztok se připraví bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 20,0 mg se rozpustí v *acetonitrilu R* a zředí se jím na 10,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí směsí rozpouštěděl na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 20,0 mg *chinonu rifampicinu CRL* se rozpustí v *acetonitrilu R* a zředí se jím na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se směsí rozpouštědel na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku obsahujícího *kyselinu fosforečnou R* 0,1 % (*V/V*), *chloristan sodný R* (1,9 g/l), *kyselinu citronovou R* (5,9 g/l) a *dihydrogenfosforečnan draselný R* (20,9 g/l) (35 + 65), s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok a nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška dvou hlavních píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky není menší než 4,0. Podle potřeby se upraví obsah acetonitrilu v mobilní fázi. Nastříkne se zkoušený roztok a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající nejméně dvojnásobku retenčního času rifampicinu: plocha píku odpovídajícího chinonu rifampicinu není větší než 1,5násobek plochy odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,5 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího chinonu rifampicinu, není větší než plocha píku rifampicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než 3,5násobek plochy píku rifampicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (3,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek píku rifampicinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 4 h při 80 °C a při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,4* na 100,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 475 nm za použití *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,4* jako kontrolního roztoku.

Vypočítá se obsah $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$; specifická absorbance je 187.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech pod dusíkem, chráněn před světlem a za teploty nepřevyšující 25 °C.

Separandum.

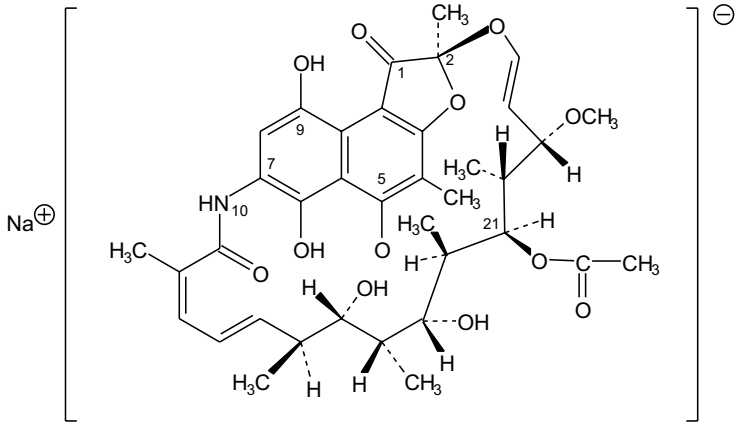
Nečistoty

A. chinon rifampicinu,
B. *N*-oxid rifampicinu.

† Rifamycinum natricum

1998

Sodná sůl rifamycinu



$C_{37}H_{46}NNaO_{12}$ $_r$ 719,76 CAS 15105-92-7

Je to (12*Z*,14*E*,24*E*)-(2*S*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*)-21-acetoxy-1,2-dihydro-6,9,17,19--tetrahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-1,11-dioxo-2,7-(epoxypentadeka-[1,11,13]trienimino)nafto[2,1-*b*]furan-5-olat sodný; monosodná sůl rifamycinu SV, získaná chemickou přeměnou rifamycinu B, který se tvoří při růstu určitých kmenů mikroorganismu *Amycolatopsis mediterranei*. Rifamycin SV se může také získat přímo z určitých mutantů *Streptomyces mediterranei*. Účinnost je nejméně 900 m.j. v miligramu, počítáno na bezvodou látku.

Výroba

Vyrábí se metodami umožňujícími snížit nebo odstranit hypotenzivní látky. Použitý výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že látka, bude-li zkoušena, vyhoví následující zkoušce:

Zkouška na neškodnost (*2.6.9*). Každé myši se vstříknou 4 mg rozpuštěné v 0,5 ml *vody na injekci R*.

Vlastnosti

Jemný nebo slabě zrnitý červený prášek. Je dobře rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v ethanolu, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli rifamycinu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 8,0. Měří se následující roztok: 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Absorbance (*2.2.25*). 20,0 mg se rozpustí v 5 ml *methanolu R* a zředí se na 100,0 ml čerstvě připraveným *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,0 (1)*, do něhož byla bezprostředně před použitím přidána *kyselina askorbová R* (1 g/l). 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným tlumivým roztokem s kyselinou askorbovou na 50,0 ml a nechá se 30 min stát. Roztok vykazuje absorpční maximum při 445 nm. Specifická absorbance v maximu je 190 až 210, počítáno na bezvodou látku.

Rifamycin B, rifamycin S a jiné příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*). Roztoky se připraví bezprostředně před použitím.

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (3,9 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,0, a *acetonitrilu R* a zředí se touto směsí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *rifamycinu B CRL* a 40,0 mg *rifamycinu S CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (3,9 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,0, a *acetonitrilu R* a zředí se touto směsí na 200,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg zkoušené látky a 8 mg *rifamycinu S CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (3,9 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu 3,0, a *acetonitrilu R* a zředí se touto směsí na 250,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1 ml/min, která je směsí následujících roztoků připravených a uchovávaných při teplotě nejméně 20 °C:
  - *mobilní fáze A* - smíchá se 10 objemových dílů *acetonitrilu R* a 90 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (3,9 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na hodnotu 7,5,
  - *mobilní fáze B* - smíchá se 70 objemových dílů *acetonitrilu R* a 30 objemových dílů roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (3,9 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným zředěným RS* na hodnotu 7,5,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 40	80 → 20	20 → 80	lineární gradient
40 - 45	20	80	izokraticky
45 - 47	20 → 80	80 → 20	lineární gradient
47 - 55	80	20	znovuustalování

- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Nastříkne se porovnávací roztok (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek se látky eluují v následujícím pořadí: rifamycin B, rifamycin SV, rifamycin S. Nastříkne se porovnávací roztok (b). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška píku rifamycinu S na získaném chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky rifamycinu SV a rifamycinu S je nejméně 5,0. Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztok (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku odpovídajícího rifamycinu B větší než plocha píku rifamycinu B na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); plocha žádného píku odpovídajícího rifamycinu S není větší než plocha píku rifamycinu S na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píků rifamycinu B a rifamycinu S, není větší než plocha píku rifamycinu S na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy píku rifamycinu S na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 12,0 % až 17,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,50 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

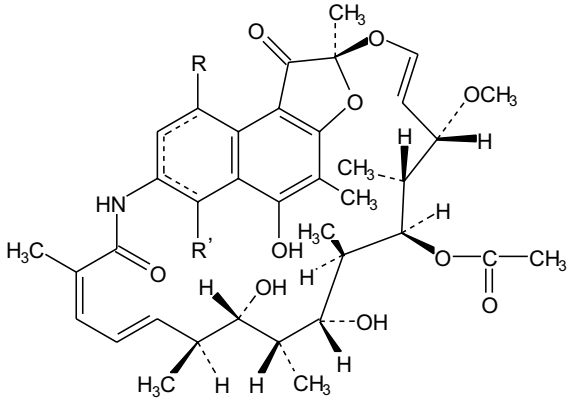
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty



A. rifamycin B: R = -O-CH_2-COOH; R′ = -OH,
B. rifamycin S: R = =O; R′ = =O,
C. rifamycin O: R = -O-CO-CH_2-O-; R′ = =O.

Rosmarini etheroleum

N

Rozmarýnová silice

Synonyma. Rosmarini aetheroleum, Oleum rosmarini

Je to silice získaná z čerstvých listů druhu *Rosmarinus officinalis* L. destilací s vodní parou.

Obsahuje 10,0 % až 15,0 % volného i vázaného borneolu, počítáno jako borneol ($C_{10}H_{18}O$; M_r 154,25).

Vlastnosti

Bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu a aromaticky hořké chuti. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, s etherem a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 5 mg *borneolu R*, 5 mg *bornylacetatu R* a 20 mg *cineolu R* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být i další méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,893 až 0,917 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,466 až 1,474.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -5° až +15°.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; 5,0 g se rozpustí v 50 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Nejvýše 0,150 g.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná v jednom objemovém dílu *lihu R* 90% *(V/V)*.

Stanovení obsahu

5,0 ml se smíchá v acetylační baňce se 7,5 ml *acetanhydridu R* a 1,0 g *octanu sodného bezvodého R* a vaří se 2 h. Pak se přidá 20,0 ml *vody R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni pod zpětným chladičem za častého protřepávání. Po ochlazení se acetylovaná silice převede do dělicí nálevky, vodná vrstva se odstraní. Acetylovaná silice se protřepává *vodou R*, až vodná vrstva reaguje na navlhčený *papír lakmusový modrý R* jen slabě kysele, vodná vrstva se vždy odstraní. Acetylovaná silice se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. 1,500 g acetylované silice se smíchá se 3 ml *lihu 96% R* a 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a po kapkách se přidává *hydroxid draselný v lihu 0,5 mol/l VS* do trvalého zbarvení. Pak se přidá 20,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a vaří se 2 h pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 0,5 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS* do změny zbarvení. Provede se slepá zkouška.

Obsah acetylovatelných složek v procentech, vyjádřeno jako geraniol ($C_{10}H_{18}O$), se vypočítá podle vzorce:

$$x = \frac{a \,.\, 7{,}712}{m - a \,.\, 0{,}021},$$

v němž značí:

a - rozdíl spotřeb *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* ve zkoušce a slepé zkoušce v mililitrech,

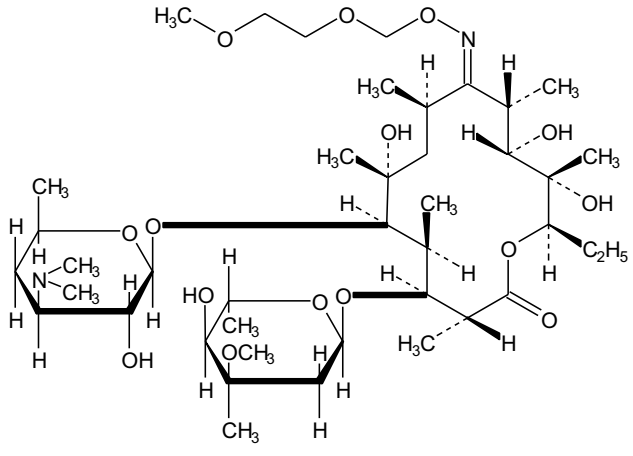
m - navážku acetylované silice v gramech.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

† Roxithromycinum

Roxithromycin



$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ $_r$ 837,06 CAS 80214-83-1

Je to (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*S*,12*R*,13*S*,14*R*)-4-[(2,6-dideoxy-3-C,3-O-dimethyl-α-L-*ribo*-hexapyranosyl)oxy]-14-ethyl-7,12,13-trihydroxy-10-{(*E*)-[(2-methoxyethoxy)methoxy]imino}--3,5,7,9,11,13-hexamethyl-6-[(3,4,6-trideoxy-3-dimethylamino-β-D-*xylo*-hexopyranosyl)--oxy]oxacyklotetradekan-2-on. Počítáno na bezvodou látku prostou rozpouštědla, obsahuje 97,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v dichlormethanu. Je těžce rozpustný ve zředěné kyselině chlorovodíkové.

Je polymorfní.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *roxithromycinu CRL*. Pokud se získaná spektra liší, zaznamenají se nová spektra roztoků zkoušené látky a referenční látky (90 g/l) v *dichlormethanu R*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas a velikost hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se přibližně shoduje s retenčním časem a velikostí hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -93° až -96°, počítáno na bezvodou látku prostou rozpouštědel; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,500 g v *acetonu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*), jak je popsáno ve zkoušce Stanovení obsahu, za použití mobilní fáze, která je směsí následujících roztoků:
- *mobilní fáze A* - k 510 ml *vody R* se přidá 200 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu amonného R* (170 g/l). Hodnota pH se upraví na 5,3 *hydroxidem sodným zředěným RS* a přidá se 315 ml *acetonitrilu R.*
- *mobilní fáze B* - směs objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (300 + 700).

Průtoková rychlost je 1 ml/min.

Gradientový program:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
	100	0	ustalování
0 - 38	100	0	izokraticky
38 - 39	100 → 90	0 - 10	lineární gradient
39 - 80	90	10	izokraticky

Před každou analýzou se kolona promývá do ustavení rovnováhy mobilní fází A nejméně 20 min.

Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy N-demethylroxithromycinu 15 min až 17 min a roxithromycinu 20 min až 22 min. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem N-demethylroxithromycinu a píkem roxithromycinu je nejméně 6 a faktor symetrie píku roxithromycinu je nejvýše 1,5. Je-li třeba, upraví se průtok mobilní fáze.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 6násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,1násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Ethanol a toluen. Nejvýše 0,2 % ethanolu a 0,1 % toluenu; provede se zkouška na zbytková rozpouštědla (*2.4.24*).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85) a zředí stejnou směsí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití porovnávacího roztoku olova (1 µg/ml) získaného zředěním základního *roztoku olova (100 g Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 40,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 5,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5,0 mg *roxithromycinu CRL* a 5,0 mg N-*demethylroxithromycinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí 510 ml *vody R*, 200 ml roztoku *dihydrogenfosforečnanu amonného R* (170 g/l), jehož hodnota pH se upraví na 5,3 *hydroxidem sodným zředěným RS*, a 315 ml *acetonitrilu R*. Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 205 nm.

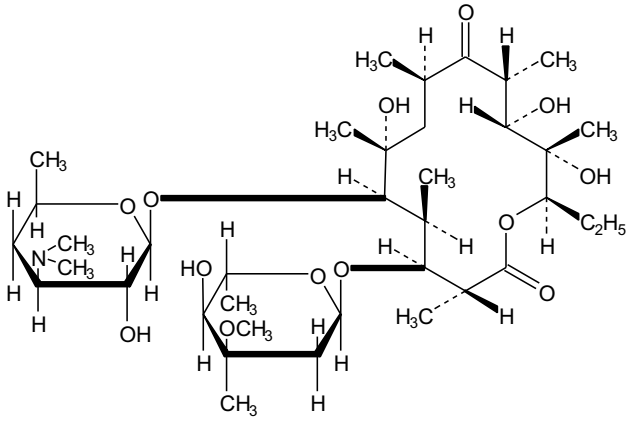
Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou retenční časy N-demethylroxithromycinu 7 min až 10 min a roxithromycinu 10 min až 13 min. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je rozlišení mezi píkem N-demethylroxithromycinu a píkem roxithromycinu nejméně 6,0 a faktor symetrie píku roxithromycinu je nejvýše 1,5.

Je-li třeba, upraví se průtok mobilní fáze. Nastříkne se odděleně zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok (a).

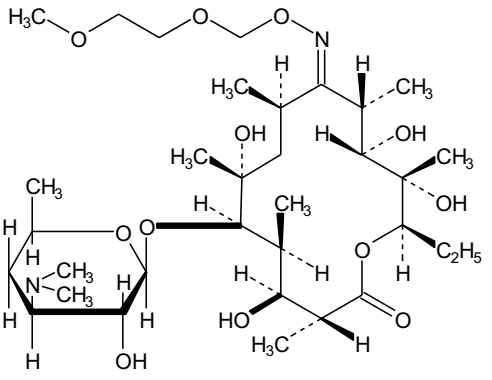
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

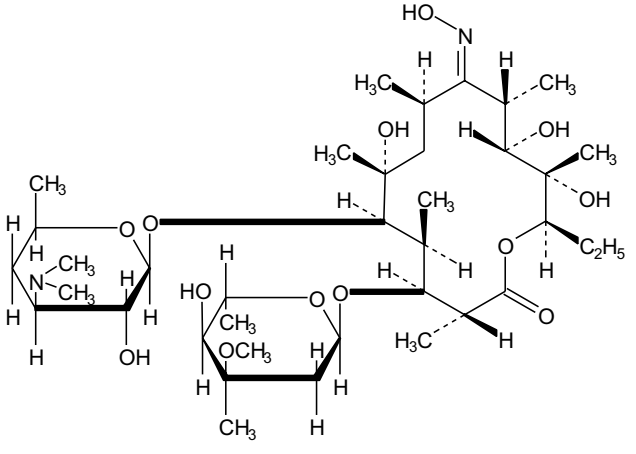
Nečistoty



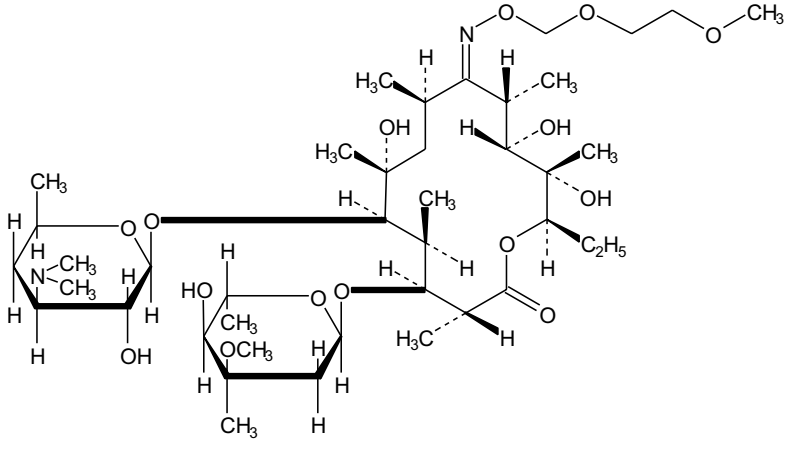
A. erythromycin A,



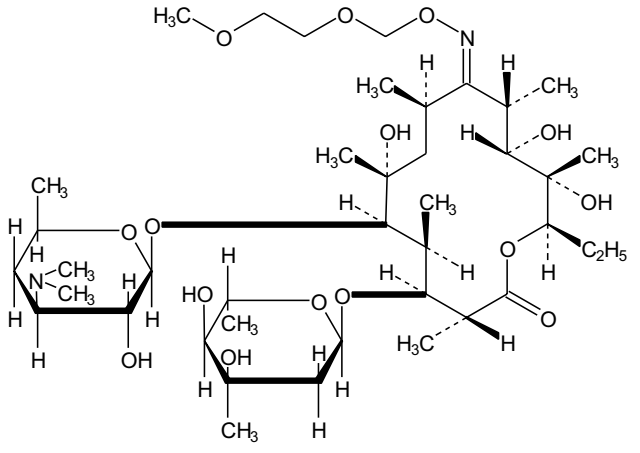
B. 4-O-de(2,6-dideoxy-3C,3-O-dimethyl-*α-ribo*-hexopyranosyl)-erythromycin-10-(*E*)-{O-[(2-methoxyethoxy)methyl]oxim},



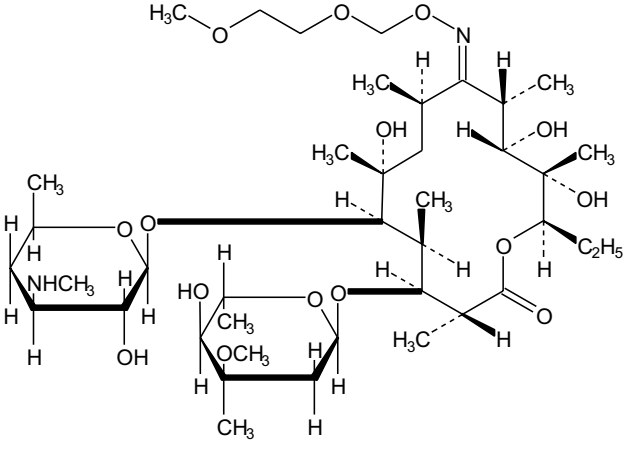
C. erythromycin-10-(*E*)-oxim,



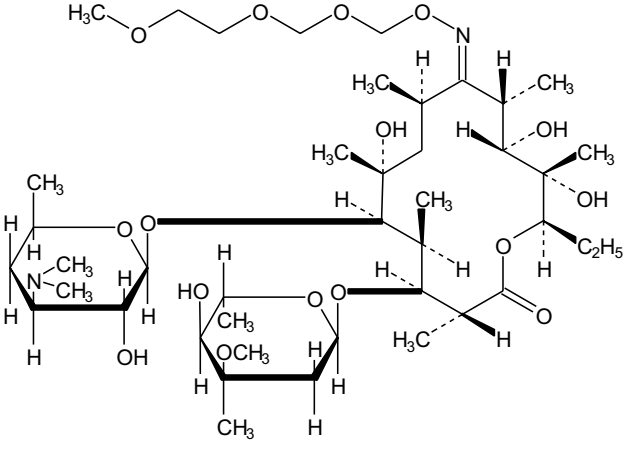
D. erythromycin-10-(*Z*)-{[(2-methoxyethoxy)methyl]oxim},



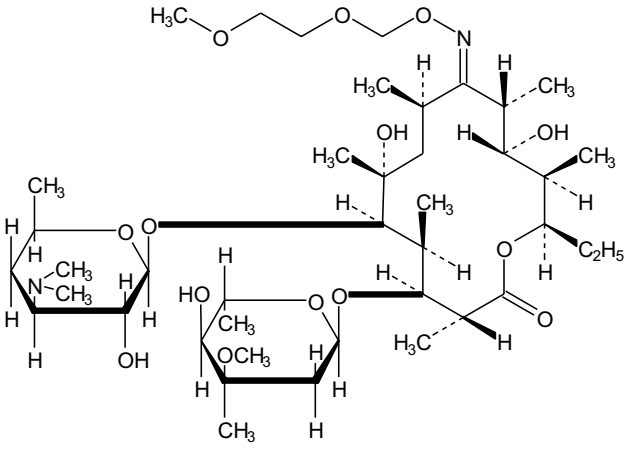
E. 3-O-demethylerythromycin(roxithromycin C)-10-(*E*)-{O-[(2-methoxyethoxy)methyl]oxim},



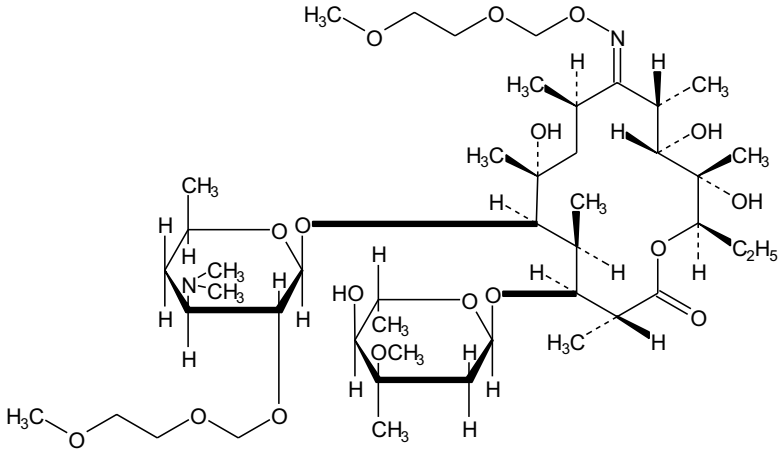
F. N-demethylerythromycin-10-(*E*)-{O-{[(2- methoxyethoxy)methyl]oxim},



G. erythromycin-10-(*E*)-{O-[(2-methoxyethoxy)methoxy]methyl]oxim},



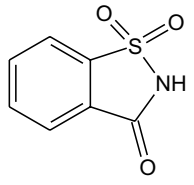
H. 13-deoxyerythromycin(roxithromycin B)-10-(*E*)-{O-[(2-methoxyethoxy)methyl]oxim},



I. 2′-O-[(2-methoxyethoxy)methyl]erythromycin-10-(*E*)-[(2-methoxyethoxy)methyl]oxim.

Saccharinum

Sacharin



$C_7H_5NO_3S$ M_r 183,18 CAS 81-07-2

Je to 1,1-dioxid 1,2-benzothiazol-3(2*H*)-3-onu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_5NO_3S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je mírně rozpustný ve vroucí vodě a v lihu 96%, těžce rozpustný ve studené vodě a v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Nasycený roztok připravený bez zahřívání zbarví *papír lakmusový modrý R* červeně.

B. Teplota tání *(2.2.14)*. 226 °C až 230 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sacharinu CRL*.

D. Asi 10 mg se smíchá s asi 10 mg *resorcinolu R*, přidá se 0,25 ml *kyseliny sírové R* a opatrně se zahřívá nad plamenem, až se směs zbarví tmavě zeleně. Po vychladnutí se přidá 10 ml *vody R* a *hydroxid sodný zředěný RS* do zásadité reakce; vzniká intenzivní zelená fluorescence.

E. K 0,2 g se přidá 1,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, odpaří se do sucha a opatrně se zahřívá, dokud směs neroztaje (nemá zuhelnatět). Nechá se vychladnout, tavenina se rozpustí v asi 5 ml *vody R*, přidá se *kyselina chlorovodíková zředěná RS* do slabě kyselé reakce, a pokud je třeba, zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,2 ml *chloridu železitého RS2;* vzniká fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve 20 ml roztoku *octanu sodného R* (200 g/l) a zředí se jím na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

2- a 4-Toluensulfonamidy. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za použití *kofeinu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 25 mg *kofeinu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.

Zkoušený roztok. 10,0 g se suspenduje ve 20 ml *vody R* a rozpustí se přidáním 5 ml až 6 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*. Pokud je třeba, upraví se pH *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* nebo

kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS na hodnotu 7 až 8 a zředí se *vodou R* na 50 ml. Protřepe se čtyřikrát 50 ml *dichlormethanu R*. Organické vrstvy se spojí, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Filtr a síran sodný se promyjí 10 ml *dichlormethanu R* a promývací tekutina se přidá k filtrátu. Filtrát se odpaří téměř do sucha ve vodní lázni, jejíž teplota nepřevyšuje 40 °C. Použitím malého množství *dichlormethanu R* se odparek kvantitativně převede do vhodné 10ml zkumavky, odpaří se do sucha proudem dusíku a odparek se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.
Kontrolní roztok. 200 ml *dichlormethanu R* se odpaří do sucha ve vodní lázni, jejíž teplota nepřevyšuje 40 °C. Zbytek se rozpustí v 1 ml *dichlormethanu R.*
Porovnávací roztok. 20,0 mg 2-*toluensulfonamidu R* a 20,0 mg 4-*toluensulfonamidu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se odpaří do sucha v proudu dusíku a odparek se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární křemenné kolony délky 10 m a vnitřního průměru 0,53 mm pokryté vrstvou (2 μm) *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- injektoru s děličem (1/2).

Teplota kolony se udržuje na 180 °C a teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 µl porovnávacího roztoku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška píku odpovídajícího kofeinu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Látky se eluují v pořadí: 2-toluensulfonamid, 4-toluensulfonamid a kofein. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím 2-toluensulfonamidu a píkem odpovídajícím 4-toluensulfonamidu je nejméně 1,5.

Nastříkne se 1 μl kontrolního roztoku a ověří se, zda na chromatogramu nejsou přítomny píky s retenčními časy stejnými jako vnitřní standard, 2-toluensulfonamid a 4-toluensulfonamid.

Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku. Jestliže jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku přítomny píky 2-toluensulfonamidu a 4-toluensulfonamidu, poměr ploch těchto píků k ploše píku vnitřního standardu není větší než odpovídající poměr na chromatogramu porovnávacího roztoku (10 μg/g 2-toluensulfonamidu a 10 μg/g 4-toluensulfonamidu).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 25 ml *lihu 96% R*, přidá se 25 ml *vody R* a 0,25 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*. Provede se slepá zkouška.

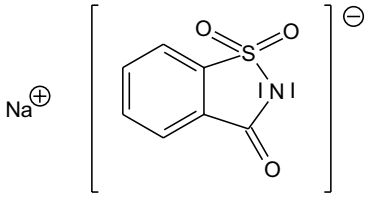
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,32 mg $C_7H_5NO_3S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Saccharinum natricum

Sodná sůl sacharinu



$C_7H_4NNaO_3S$ M_r 205,16 CAS 128-44-9

Je to sodná sůl 1,1-dioxid-1,2-benzothiazol-3(2*H*)-onu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_4NNaO_3S$. Může obsahovat různé množství vody.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky, větrající na suchém vzduchu. Je snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v lihu 96% a prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. K 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidají 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS.* Vznikne bílá sraženina, která se odfiltruje, promyje *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C; taje *(2.2.14)* při 226 °C až 230 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sodné soli sacharinu CRL*. Látky se před zkouškou vysuší při 100 °C až 105 °C.

C. Asi 10 mg se smíchá s asi 10 mg *resorcinolu R*, přidá se 0,25 ml *kyseliny sírové R* a opatrně se zahřívá nad plamenem, až se směs zbarví tmavě zeleně. Po vychladnutí se přidá 10 ml *vody R* a *hydroxid sodný zředěný RS* do zásadité reakce; vzniká intenzivní zelená fluorescence.

D. K 0,2 g se přidá 1,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, odpaří se do sucha a opatrně se zahřívá, dokud směs neroztaje (nemá zuhelnatět). Nechá se vychladnout, tavenina se rozpustí v asi 5 ml *vody R*, přidá se *kyselina chlorovodíková zředěná RS* do slabě kyselé reakce, a pokud je třeba, zfiltruje se. K filtrátu se přidá 0,2 ml *chloridu železitého RS2;* vzniká fialové zabarvení.

E. 0,5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10,0 ml roztoku S se přidá 5,0 ml *kyseliny sírové 0,005 mol/l VS*, zahřeje se k varu a ochladí se. Přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na růžové se spotřebuje 4,5 ml až 5,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

2- a 4-Toluensulfonamidy. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za použití *kofeinu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 25 mg *kofeinu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100 ml.

Zkoušený roztok. 10,0 g se rozpustí v 50 ml *vody R*. Pokud je třeba, upraví se pH *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* nebo *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na hodnotu 7 až 8 a protřepe se čtyřikrát s 50 ml *dichlormethanu R*. Organické vrstvy se spojí, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltrují se. Filtr a síran sodný se promyjí 10 ml *dichlormethanu R* a promývací tekutina se přidá k filtrátu. Filtrát se odpaří téměř do sucha ve vodní lázni, jejíž teplota nepřevyšuje 40 °C. Použitím malého množství *dichlormethanu R* se odparek kvantitativně převede do vhodné 10ml zkumavky, odpaří se do sucha v proudu dusíku a odparek se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Kontrolní roztok. 200 ml *dichlormethanu R* se odpaří do sucha ve vodní lázni, jejíž teplota nepřevyšuje 40 °C. Zbytek se rozpustí v 1 ml *dichlormethanu R.*

Porovnávací roztok. 20,0 mg 2-*toluensulfonamidu R* a 20,0 mg 4-*toluensulfonamidu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *dichlormethanem R* na 50,0 ml. 5,0 ml posledního roztoku se odpaří do sucha v proudu dusíku a odparek se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární křemenné kolony délky 10 m a vnitřního průměru 0,53 mm pokryté vrstvou (2 μm) *polymethylfenylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- injektoru s děličem (1/2).

Teplota kolony se udržuje na 180 °C a teplota vstřikovacího prostoru a detektoru na 250 °C.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška píku odpovídajícího kofeinu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Látky se eluují v pořadí: 2-toluensulfonamid, 4-toluensulfonamid a kofein. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem odpovídajícím 2-toluensulfonamidu a píkem odpovídajícím 4-toluensulfonamidu je nejméně 1,5.

Nastříkne se 1 μl kontrolního roztoku a ověří se, zda na chromatogramu nejsou přítomny píky s retenčními časy stejnými jako vnitřní standard, 2-toluensulfonamid a 4-toluensulfonamid.

Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku. Jestliže jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku přítomny píky 2-toluensulfonamidu a 4-toluensulfonamidu, poměr ploch těchto píků k ploše píku vnitřního standardu není větší než odpovídající poměr na chromatogramu porovnávacího roztoku (10 μg/g 2-toluensulfonamidu a 10 μg/g 4-toluensulfonamidu).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 15,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,52 mg $C_7H_4NNaO_3S$.

Uchovávání

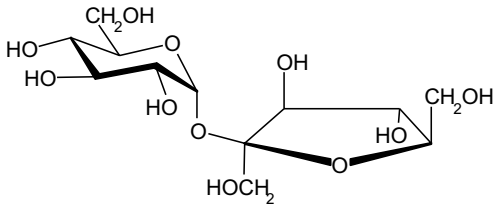
Ve vzduchotěsných obalech.

Saccharosum

1998

Sacharosa

Synonymum. Saccharum



$C_{12}H_{22}O_{11}$ M_r 342,30 CAS 57-50-1

Je to β-D-fruktofuranosyl-α-D-glukopyranosid. Neobsahuje aditiva.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo lesklé suché bezbarvé nebo bílé krystaly. Je velmi snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v ethanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sacharosy CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *fruktosy CRL*, 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku, nanesené body se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla musí být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi 5 ml *kyseliny sírové R* a 95 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

C. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 100 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidá 0,15 ml čerstvě připraveného *síranu měďnatého RS* a 2 ml čerstvě připraveného *hydroxidu sodného zředěného RS;* roztok je modrý a čirý, povařením se vzhled roztoku nemění. Horký roztok se smíchá se 4 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, vaří se 1 min a pak se přidají 4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS;* ihned vznikne oranžová sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 50,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,3 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení roztoku na růžové se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Měrná elektrická vodivost *(2.2.38)*. Nejvýše 35 μS.cm^{-1}. 31,3 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se jí na 100,0 ml. Měrná elektrická vodivost roztoku (C_1) a vody (C_2) použité k přípravě roztoku se měří za mírného míchání na elektromagnetické míchačce. Hodnoty naměřené v průběhu 30 s musí být stálé, mohou kolísat v rozmezí nejvýše 1 %. Měrná elektrická vodivost se vypočítá podle vzorce:

$$C_1 - 0{,}35C_2 .$$

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +66,3° až +67,0°. Měří se roztok připravený rozpuštěním 26,0 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 100,0 ml.

Dextriny. Pokud je látka určena k přípravě velkoobjemových parenterálních přípravků, vyhovuje této zkoušce na dextriny: 2 ml roztoku S se smíchají s 8 ml *vody R,* 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 0,05 ml *jodu 0,05 mol/l VS;* roztok zůstává zbarven žlutě.

Glukosa a invertní cukr. 5 ml roztoku S se ve zkumavce délky asi 150 mm a vnitřního průměru 16 mm smíchá s 5 ml *vody R*, přidá se 1,0 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l VS* a 1,0 ml roztoku *modři methylenové R* (1 g/l). Po promíchání se zahřívá přesně 2 min ve vodní lázni a ihned se pozoruje. Modré zbarvení roztoku úplně nezmizí (0,04 %). Nepřihlíží se k modrému zbarvení rozhraní vzduchu a roztoku.

Siřičitany.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí ve 40 ml *vody R*, přidají se 2,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 3 mol/l RS*, 2,0 ml *fuchsinu RS1* a 2,0 ml roztoku *formaldehydu R* 0,5% *(V/V)* a 30 min se nechá stát.

Porovnávací roztok. 76 mg *disiřičitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 3,0 ml tohoto roztoku se přidají 4,0 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se ihned přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 3 mol/l RS*, 2,0 ml *fuchsinu RS1* a 2,0 ml roztoku *formaldehydu R* 0,5% *(V/V)* a 30 min se nechá stát.

Měří se absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při 583 nm proti kontrolnímu roztoku připravenému současně stejným způsobem za použití 10,0 ml *vody R*. Absorbance zkoušeného roztoku není vyšší než absorbance porovnávacího roztoku (15 μg SO_2/g).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže porovnávací roztok je zřetelně fialově červeně zbarven.

Olovo. Nejvýše 0,5 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)* za použití přístroje s grafitovou pícku.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v 0,5 ml *kyseliny dusičné prosté olova R* v polyfluoruhličitanové tlakové nádobě a zahřívá se 5 h při 150 °C. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 5,0 ml.

Měří se absorbance při 283,3 nm; sušicí teplota pícky se udržuje na 110 °C, spalovací teplota na 600 °C a rozprašovací teplota na 2100 °C.

Ztráta sušením *(2.2.32).* Nejvýše 0,1 %; 2,000 g se suší 3 h v sušárně při 105 °C.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14).* Pokud je látka určena k přípravě velkoobjemových parenterálních přípravků, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v miligramu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

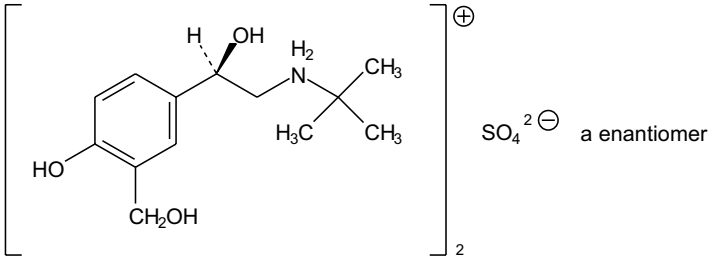
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro přípravu velkoobjemových parenterálních přípravků.

† Salbutamoli sulfas

1998

Salbutamoliumsulfat



$C_{26}H_{44}N_2O_{10}S$ M_r 576,70 CAS 51022-70-9

Je to bis{(*RS*)-[2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-hydroxymethylfenyl)ethyl]terc.butylamonium}sulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{26}H_{44}N_2O_{10}S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v etheru, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 80,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 276 nm. Specifická absorbance v maximu je 55 až 64.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *salbutamoliumsulfatu CRL*. Měří se tablety látek s *bromidem draselným R*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 50 ml roztoku *tetraboritanu sodného R* (20 g/l), přidá se 1 ml roztoku *aminopyrazolonu R* (30 g/l), 10 ml *dichlormethanu R* a 10 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (20 g/l). Protřepe se a nechá se oddělit; vzniká oranžově červené zbarvení organické vrstvy.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,15 ml *červeně methylové RS* a 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok je žlutý. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,24 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok. 12 mg *salbutamoliumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R*, *ethylacetatu R*, *2-propanolu R* a *isobutylmethylketonu R* (3 + 18 + 35 + + 45 + 50) po dráze 18 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel, postříká se roztokem *methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu R* (1 g/l) v roztoku *methanolu R* 90% (*V/V*), potom se postříká roztokem *hexakyanoželezitanu draselného R* (20 g/l) ve směsi objemových dílů *amoniaku 32% R* a *vody R* (1 + 3) a pak se znovu postříká roztokem *methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu R* (1 g/l) v roztoku *methanolu R* 90% (*V/V*). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Bor.

Zkoušený roztok. K 50 mg se přidá 5 ml roztoku obsahujícího *uhličitan sodný bezvodý R* (13 g/l) a *uhličitan draselný R* (17 g/l). Roztok se odpaří do sucha na vodní lázni, zbytek se usuší při 120 °C a potom se vyžíhá do úplného spálení organické hmoty. Po ochlazení se ke zbytku přidá 0,5 ml *vody R*, 3,0 ml čerstvě připraveného roztoku *kurkuminu R* (1,25 g/l) v *kyselině octové ledové R* a

mírně se zahřeje do rozpuštění. Potom se ochladí, přidají se 3,0 ml směsi připravené opatrným přidáváním za stálého míchání 5 ml *kyseliny sírové R* k 5 ml *kyseliny octové ledové R*, promíchá se a nechá se 30 min stát. Potom se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml a zfiltruje.
Porovnávací roztok. 0,572 g *kyseliny borité R* se rozpustí v 1000,0 ml *vody R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 2,5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml roztoku obsahujícího *uhličitan sodný bezvodý R* (13 g/l) a *uhličitan draselný R* (17 g/l) a dále se pokračuje stejným způsobem jako u zkoušeného roztoku.

Měří se absorbance (*2.2.25)* zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při asi 555 nm. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (50 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R,* přidá se 35 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 57,67 mg $C_{26}H_{44}N_2O_{10}S$.

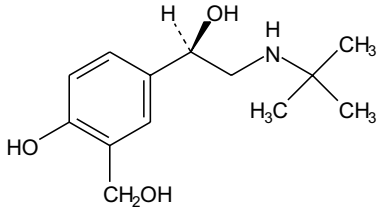
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Salbutamolum

1998

Salbutamol



a enantiomer

$C_{13}H_{21}NO_3$ M_r 239,31 CAS 18559-94-9

Je to (*RS*)-2-terc.butylamino-1-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)fenyl]ethanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{21}NO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a těžce rozpustný v etheru.

Taje při asi 155 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 80,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 276 nm. Specifická absorbance v maximu je 66 až 75.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *salbutamolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 50 ml roztoku *tetraboritanu sodného R* (20 g/l), přidá se 1 ml roztoku *aminopyrazolonu R* (30 g/l), 10 ml *dichlormethanu R* a 10 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (20 g/l). Protřepe se a nechá se oddělit; vzniká oranžově červené zbarvení organické vrstvy.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *salbutamolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R*, *ethylacetatu R*, *2-propanolu R* a *isobutylmethylketonu R* (3 + 18 + 35 + + 45 + 50) po dráze 18 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu rozpouštědel, postříká se roztokem *methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu R* (1 g/l) v *methanolu R* 90% (*V/V*), potom se postříká roztokem *hexakyanoželezitanu draselného R* (20 g/l) ve směsi objemových dílů *amoniaku 32% R* a *vody R* (1 + 3) a pak se znovu postříká roztokem *methylbenzothiazolinonhydrazonhydrochloridu R* (1 g/l) v *methanolu R* 90% (*V/V*). Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Bor.

Zkoušený roztok. K 50 mg se přidá 5 ml roztoku obsahujícího *uhličitan sodný bezvodý R* (13 g/l) a *uhličitan draselný R* (17 g/l). Roztok se odpaří do sucha na vodní lázni, zbytek se usuší při 120 °C a potom se vyžíhá do úplného spálení organické hmoty. Po ochlazení se ke zbytku přidá 0,5 ml *vody R*, 3,0 ml čerstvě připraveného roztoku *kurkuminu R* (1,25 g/l) v *kyselině octové ledové R* a mírně se zahřeje do rozpuštění. Potom se ochladí, přidají se 3,0 ml směsi připravené opatrným přidáváním za stálého míchání 5 ml *kyseliny sírové R* k 5 ml *kyseliny octové ledové R*, promíchá se a nechá se 30 min stát. Potom se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml a zfiltruje.
Porovnávací roztok. 0,572 g *kyseliny borité R* se rozpustí v 1000,0 ml *vody R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml. Ke 2,5 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml roztoku obsahujícího *uhličitan*

sodný bezvodý R (13 g/l) a *uhličitan draselný R* (17 g/l) a dále se pokračuje stejným způsobem jako u zkoušeného roztoku.

Měří se absorbance (*2.2.25)* zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku v maximu při asi 555 nm. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (50 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,93 mg $C_{13}H_{21}NO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Salviae folium

N

Šalvějový list

Synonymum. Folium salviae

Je to usušený list druhu *Salvia officinalis* L. Obsahuje nejméně 15 ml silice v kilogramu celé drogy a nejméně 10 ml silice v kilogramu řezané drogy, vztaženo na sušinu.

Vlastnosti

Droga charakteristického kořenitého pachu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. List je celý nebo řezaný. Čepel listu asi 2 cm až 10 cm dlouhá a 1 cm až 5 cm široká, obvejčitá až oválná, s okrajem jemně vroubkovaným až celokrajným. Čepel na horním konci zaokrouhlená nebo zašpičatělá, na bázi zaokrouhlená nebo téměř srdčitá. Řapíkatý list je na svrchní straně šedozelený, jemně zrnitý, na spodní straně bílý, pýřitý, s hustou sítí vyniklých žilek.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle šedý až hnědozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné mnohobuněčné svazčité krycí chlupy nebo jejich úlomky s výrazně ztlustlou bazální buňkou a ostatními buňkami tenkostěnnými s úzkým luminem; úlomky svrchní pokožky s tečkovanými mnohohrannými buňkami; úlomky spodní pokožky s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými a četnými diacytickými průduchy (*2.8.3*); zřídka jednotlivé žláznaté chlupy s jednobuněčnou až čtyřbuněč-

nou nohou a jednobuněčnou až dvoubuněčnou hlavičkou;žláznaté chlupy s jednobuněčnou nohou a hlavičkou z osmipaprsčitě uspořádaných sekrečních buněk se společnou vyniklou kutikulou.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,30 g čerstvě upráškované drogy (355) se 2 min až 3 min protřepává s 5,0 ml *toluenu R* a zfiltruje se.
Porovnávací roztok (a). 3 mg *borneolu R* se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R*.
Porovnávací roztok (b). 5 μl *thujonu R* se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R*.
Porovnávací roztok (c). 10 μl *cineolu R* se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku a po 10 μl každého porovnávacího roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrny skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) a navíc mohou být přítomny ještě další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 % stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 20,0 g práškované drogy (355).

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 20,0 g čerstvě upráškované drogy (710) se destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s 200 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Salviae herba

N

Šalvějová nať

Synonymum. Herba salviae

Je to usušená nať druhu *Salvia officinalis* L. *sensu lato*. Obsahuje nejméně 10 ml silice v kilogramu drogy.

Vlastnosti

Droga charakteristického pachu, aromatické, nahořklé a svíravé chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Stonky zaobleně čtyřhranné, až 5 mm silné, šedoplstnaté až olysalé. Listy řapíkaté, obvejčité až oválné, na bázi zaokrouhlené nebo téměř srdčité. Čepel listu až 10 cm dlouhá a 1 cm až 5 cm široká, s jemně vroubkovaným okrajem. Listy na svrchní straně šedozelené, jemně zrnité, na spodní straně bílé, šedoplstnaté, s hustou sítí vyniklých žilek.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četné mnohobuněčné krycí chlupy nebo jejich úlomky s výrazně ztlustlou bazální buňkou a ostatními buňkami tenkostěnnými s úzkým luminem; úlomky svrchní pokožky listu s tečkovanými mnohohrannými buňkami; úlomky spodní pokožky listu s buňkami se stěnami vlnitě zprohýbanými a s četnými diacytickými průduchy (*2.8.3*); zřídka jednotlivé žláznaté chlupy s jednobuněčnou až čtyřbuněčnou nohou a jednobuněčnou až dvoubuněčnou hlavičkou; žláznaté chlupy s jednobuněčnou nohou a hlavičkou z osmi paprsčitě uspořádaných sekrečních buněk; úlomky stonku s buňkami více nebo méně ztlustlými; cévy jednotlivě nebo ve skupinách, provázené sklerenchymatickými vlákny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,50 g čerstvě upráškované drogy (355) se 2 min až 3 min protřepává s 5,0 ml *toluenu R* a zfiltruje se.
Porovnávací roztok (a). 3 mg *borneolu R* se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R*.
Porovnávací roztok (b). 5 μl *thujonu R* se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R*.
Porovnávací roztok (c). 10 μl *cineolu R* se rozpustí v 10,0 ml *toluenu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) 30 μl zkoušeného roztoku a po 10 μl každého porovnávacího roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se čerstvě připraveným roztokem *kyseliny fosfomolybdenové R* (100 g/l) v *lihu 96% R*, suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrny skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramech porovnávacích roztoků (a), (b) a (c) a navíc mohou být přítomny ještě další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 3 % stonků silnějších než 5 mm.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Stanovení obsahu

Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 10,0 g čerstvě upráškované drogy (710) se destiluje 90 min rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v 500ml baňce s 200 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R*.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Sambuci flos

1998

Květ bezu černého

Synonymum. Flos sambuci

Je to usušený květ druhu *Sambucus nigra* L. Obsahuje nejméně 0,80 % flavonoidů, počítáno jako isokvercitrin ($C_{21}H_{20}O_{12}$; M_r 464,4), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Květ pětičetný o průměru asi 5 mm, krátce stopkatý. Kalich malý, s pěti ušty; koruna kolovitá světle žlutá; široce oválné korunní lístky jsou na bázi srostlé. Nitky světle žlutých tyčinek se střídají s korunními lístky. Koruna se vyskytuje často samostatně nebo spolu s tyčinkami, které jsou k bázi koruny přirostlé. Semeník spodní, trojpouzdrý, s přisedlou, trojlaločnou bliznou.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: četná pylová zrna kulovitá, někdy oválná o průměru asi 30 μm, se třemi klíčními póry a velmi jemně tečkovanou exinou; pokožka kalicha s buňkami s rýhovanou kutikulou, zřídka s jednobuněčnými, kuželovitými, krycími chlupy z okrajů bazální části lístků; úlomky koruny s četnými malými kapkami silice, buňky pokožky se stěnami zprohýbanými, na svrchní straně slabě ztlustlé, a rýhovanou kutikulou; v mezofylu koruny a kalicha jsou idioblasty obsahující četné pískovité krystaly šťavelanu vápenatého.

C. Zkouška Sambucus ebulus, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je intenzivní modrá skvrna (kyselina chlorogenová), oranžová skvrna (rutin) a v poloze těsně nad skvrnou hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku oranžová skvrna (isokvercitrin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku je zelenomodrá skvrna v poloze těsně pod skvrnou kyseliny kávové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být přítomny další, slabě zbarvené skvrny; v denním světle je zřetelná jen oranžová skvrna rutinu a isokvercitrinu.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Nejvýše 8 % úlomků květních stopek a jiných cizích příměsí, nejvýše 15 % zhnědlých květů; stanoví se s 10 g drogy.

***Sambucus ebulus* L.** Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje a filtrát se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Porovnávací roztok. 1 mg *kyseliny kávové R*, 1 mg *kyseliny chlorogenové R*, 2,5 mg *hyperosidu R* a 2,5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese do pruhů po 10 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *2-butanonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*, pak se postříká roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Vrstva se suší 30 min na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou v dolní polovině (v pořadí stoupajících hodnot R_F) patrny fluoreskující skvrny: oranžová (rutin), světle modrá (kyselina chlorogenová) a oranžově žlutá až oranžově hnědá (hyperosid), v horní třetině je zelenomodrá skvrna (kyselina kávová). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není růžová skvrna pod skvrnou odpovídající rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 10,0 %.

Stanovení obsahu

Základní roztok. 0,600 g práškované drogy (355) se ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchá s 1 ml roztoku *methenaminu R* (5 g/l), 20 ml *acetonu R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Zfiltruje se přes chomáček vaty. Droga i chomáček vaty se vaří 10 min ještě dvakrát s 20 ml *acetonu R* pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje vždy přes nový chomáček vaty. Spojené acetonové roztoky se zfiltrují filtračním papírem do odměrné baňky a zředí se *acetonem R* předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, přidá se 20 ml *vody R* a protřepává se 15 ml a pak třikrát 10 ml *ethylacetatu R*. Spojené horní vrstvy se protřepávají dvakrát 50 ml *vody R*, zfiltrují se přes 10 g *síranu sodného bezvodého R* do odměrné baňky a zředí se *ethylacetatem R* na 50,0 ml.
Zkoušený roztok. 10,0 ml základního roztoku se smíchá s 1 ml *chloridu hlinitého RS1* a zředí se roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% *(V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 10,0 ml základního roztoku se zředí roztokem *kyseliny octové ledové R* 5% *(V/V)* v *methanolu R* na 25,0 ml.

Po 30 min se měří absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm za použití porovnávacího roztoku jako kontrolní tekutiny. Obsah flavonoidů v procentech, počítáno jako isokvercitrin ($C_{21}H_{20}O_{12}$), se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A \ . \ 1{,}25}{m} ,$$

v němž značí:
A - absorbanci roztoku v maximu při 425 nm,
m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance isokvercitrinu je 500.

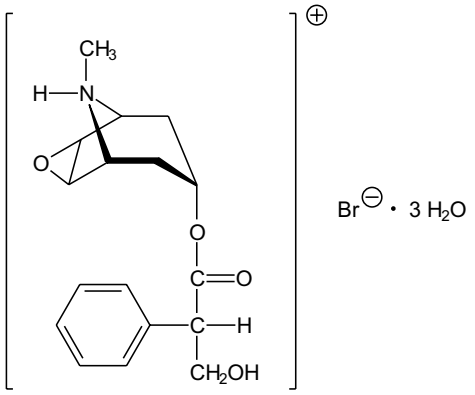
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

†† Scopolamini hydrobromidum

Skopolaminiumbromid

Synonyma. Scopolaminium bromatum, Hyoscini hydrobromidum



$C_{17}H_{22}BrNO_4 . 3H_2O$ M_r 438,31 CAS 6533-68-2

Je to trihydrát 6ß,7ß-epoxy-3α(1α*H*,5α*H*)-tropoyloxy-(*S*)-tropaniumbromidu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{22}BrNO_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly, na vzduchu zvětrávající. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 197 °C, za rozkladu; teplota tání se stanoví po sušení ve vakuu po dobu 24 h a pak při 100 °C až 105 °C po dobu 2 h.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *skopolaminiumbromidu CRL*. Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, postupuje se následovně: 3 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *chloroformu R*, přidá se 0,2 g *bromidu draselného R*, 15 ml *etheru R*, nechá se 5 min stát za občasného protřepání a dekantuje se. Zbytek se suší na vodní lázni tak dlouho, dokud nevymizí pach rozpouštědla. Ze zbytku se připraví tableta, která se suší 3 h při 100 °C až 105 °C.

Stejným způsobem se připraví tableta *skopolaminiumbromidu CRL* a zaznamenají se nová spektra.

B. 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidává se po kapkách za protřepávání 5 ml *trinitrofenolu RS*. Vzniklá sraženina se odfiltruje, promyje se *vodou R* a suší se 2 h při 100 °C až 105 °C; taje *(2.2.14)* při 188 °C až 193 °C.

C. K asi 1 mg se přidá 0,2 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se ve vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí ve 2 ml *acetonu R* a přidá se 0,1 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *methanolu R;* vznikne fialové zbarvení.

D. Vyhovuje zkouškám na bromidy *(2.3.1)*.

E. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 5,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -24° až -27°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S.

Cizí alkaloidy a rozkladné produkty. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *acetonu R* a *chloroformu R* (2 + 10 + 30 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C a po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS* do vzniku skvrn. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %) a nejvýše jedna skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se ke žluté skvrně na startu.

Apohyoscin. Asi 0,5 %; 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 245 nm. Specifická absorbance, počítaná na bezvodou látku, není větší než 3,6.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 10,0 % až 13,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové bezvodé R*, v případě potřeby zahřátím. K ochlazenému roztoku se přidá 20 ml *dioxanu R,* 7 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 38,43 mg $C_{17}H_{22}BrNO_4$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných, zcela naplněných, maloobjemových obalech, chráněn před světlem, při teplotě pod 15 °C.

Venenum.

† Selenii disulfidum

Sulfid seleničitý

SeS_2 M_r 143,08 CAS 7488-56-4

Obsahuje 52,0 % až 55,5 % selenu (Se).

Vlastnosti

Jasně oranžový nebo červenohnědý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 50 mg se smíchá s 5 ml *kyseliny dusičné R* a vaří se mírně 30 min, pak se zředí *vodou R* na 50 ml a zfiltruje se. K 5 ml filtrátu se přidá 10 ml *vody R* a 5 g *močoviny R*. Zahřeje se k varu a po ochlazení se přidá 1,5 ml *jodidu draselného RS*. Vznikne žluté až oranžové zbarvení, které stáním rychle tmavne. Tento roztok se použije při zkoušce totožnosti B.

B. Zbarvený roztok ze zkoušky totožnosti A se po 10 min stání zfiltruje přes *křemelinu H R*. 5 ml filtrátu vyhovuje zkoušce (a) na sírany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Rozpustné sloučeniny selenu. 10 g se smíchá se 100 ml *vody R,* dobře se promíchá a za častého protřepávání se nechá stát 1 h, pak se zfiltruje. 10 ml filtrátu se smíchá se 2 ml roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (115 g/l) a zředí se *vodou R* na 50 ml.

Hodnota pH roztoku se upraví na 2,0 až 3,0 roztokem *kyseliny mravenčí bezvodé R* (115 g/l). Pak se přidají 2 ml roztoku *3,3´-diamoniumbenzidiniumtetrachloridu R* (5 g/l). Po 45 min stání se upraví hodnota pH na 6,0 až 7,0 *amoniakem zředěným RS1.* Roztok se protřepává 1 min s 10 ml *toluenu R*, nechá se ustát a spodní vrstva se odstraní. Absorbance *(2.2.25)* horní vrstvy měřená při 420 nm není vyšší než absorbance porovnávacího roztoku současně připraveného uvedeným způsobem začínajícím slovy "...se smíchá se 2 ml roztoku *kyseliny mravenčí bezvodé R* (115 g/l) ...", za použití 5 ml základního *roztoku selenu (1 μg Se/ml)* (5 μg/ml, počítáno jako Se).

Stanovení obsahu

0,100 g se smíchá s 25 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a zahřívá se 1 h na vodní lázni; může zůstat malý nerozpuštěný zbytek. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 25,0 ml se smíchá s 50 ml *vody R* a 5 g *močoviny R* a zahřeje se k varu. Po ochlazení se přidá 7 ml *jodidu draselného RS* a 3 ml *škrobu RS* a ihned se titruje *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS.* Provede se slepá zkouška.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 1,974 mg Se.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Separandum.

Sennae folium

1998

Sennový list

Synonyma. Folium sennae, kasiový list

Jsou to usušené lístky druhu *Cassia senna* L. (*Cassia acutifolia* DELILE) známého jako Alexandrijská nebo Chartúm senna nebo druhu *Cassia angustifolia* VAHL známého jako Tinnevelly senna nebo směs obou druhů. Obsahuje nejméně 2,5 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako sennosid B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; M_r 863), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga slabého charakteristického pachu.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. *C. senna*: šedozelené až hnědozelené, tenké, křehké lístky, kopinaté, ostnitě zašpičatělé, na bázi nesouměrné, obvykle 15 mm až 40 mm dlouhé a 5 mm až 15 mm široké. List je nejširší pod svojí střední částí. Čepel lístku slabě zvlněná, na obou stranách s jemnými, krátkými chlupy. Zpeřená žilnatina je patrná zejména na spodní straně. Postranní žilky svírají s hlavní žilkou úhel asi 60°, na okraji čepele anastomozují.
Stomatální index (*2.8.3*): 10-**12,5**-15.

C. angustifolia: žlutozelené až hnědozelené lístky, protáhle kopinaté, na bázi poněkud nesouměrné, zpravidla 20 mm až 50 mm dlouhé a ve střední části 7 mm až 20 mm široké. Na obou stranách s roztroušenými krátkými chlupy, často s výraznými příčnými nebo šikmými pruhy.
Stomatální index (*2.8.3*): 14-**17,5**-20.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle zelený až zelenožlutý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: mnohohranné buňky pokožky s paracytickými průduchy (*2.8.3*); jednobuněčné kuželovité na povrchu bradavčité chlupy jednotlivě nebo spolu s úlomky pokožky; úlomky svazků cévních provázených buňkami s krystaly šťavelanu vápenatého; drúzy šťavelanu vápenatého jednotlivě nebo v úlomcích parenchymu.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (2.2.27) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (180) se zahřeje k varu s 5 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R*. Směs se odstřeďuje a použije se supernatantní tekutina.
Porovnávací roztok. 10 mg *Sennae extractum CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (roztok obsahuje malý sediment).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 2 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (1 + 30 + 40 + 40) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny dusičné R* 20% *(V/V)* a zahřívá se 10 min při 120 °C. Po vychladnutí se stříká roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) do objevení skvrn. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (v pořadí stoupajících hodnot R_F až do

střední části chromatogramu - sennosidy B, A, D a C), zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidu D a C může být patrná červená skvrna rhein-8-glukosidu.

D. Asi 25 mg práškované drogy (180) se smíchá v kuželové baňce s 50 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe 40 ml *etheru R*. Vrchní vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*. 5 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha. Odparek se po vychladnutí smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1;* vzniká žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 % a nejvýše 1 % jiných částí matečné rostliny.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,5 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před přímým světlem.

0,150 g práškované drogy (180) se smíchá v baňce o obsahu 100 ml se 30,0 ml *vody R*. Baňka se zváží a pak se zahřívá 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zváží, a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost *vodou R*. Odstřeďuje se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepe se třikrát 15 ml *chloroformu R*. Spodní vrstva se po oddělení vždy odstraní. K vrchní vrstvě se přidá 0,10 g *hydrogenuhličitanu sodného R*, 3 min se protřepává, pak se odstřeďuje. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zábrusem, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a promíchá se. Směs se zahřívá 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a znovu se zahřívá 20 min ve vodní lázni za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml *etheru R*, etherem se vždy nejprve propláchne baňka. Spojené etherové výtřepky se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*, převedou se do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B $C_{42}H_{38}O_{20}$, podle vzorce:

$$\frac{A \ . \ 1{,}25}{m} ,$$

v němž značí:

A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,

m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance sennosidu B je 240.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

Sennae fructus acutifoliae

1998

Plod kasie ostrolisté

Synonyma. Sennový plod, Sennae foliculus

Je to usušený plod druhu *Cassia senna* L. (*C. acutifolia* DELILE), známého jako Alexandrijská senna.

Obsahuje nejméně 3,4 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako sennosid B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; M_r 863), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga má slabý pach.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Ploché ledvinité lusky, zelené až zelenohnědé s hnědými skvrnami odpovídajícími poloze semen, zpravidla 40 mm až 50 mm dlouhé a nejméně 20 mm široké. Jsou výrazně zašpičatělé, krátce stopkaté. Lusky obsahují šest až sedm plochých opakvejčitých semen, zelených až světle hnědých; osemení s uzavřenými, síťovitými, vyniklými žebry.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: oplodí s mnohohrannými buňkami a malým množstvím kuželovitých, na povrchu bradavčitých chlupů, občas s anomocytickými nebo paracytickými průduchy (*2.8.3*); dvě vrstvy zkřížených vláken obklopených komůrkovými vlákny s krystaly šťavelanu vápenatého; charakteristické palisádové buňky semene a vrstevnaté buňky endospermu; drúzy a krystaly šťavelanu vápenatého.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (180) se zahřeje k varu s 5 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R*. Směs se odstřeďuje a použije se supernatantní tekutina. *Porovnávací roztok.* 10 mg *Sennae extractum CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (roztok obsahuje malý sediment).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 2 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (1 + 30 + 40 + 40) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny dusičné R* 20% (*V/V*) a zahřívá se 10 min při 120 °C, po vychladnutí se stříká roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) do objevení skvrn. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (v pořadí stoupajících hodnot R_F až do střední části chromatogramu - sennosidy B, A, D a C), zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidu D a C může být patrna červe-

ná skvrna rhein-8-glukosidu. Skvrny odpovídající sennosidu D a C jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku zbarveny slabě.

D. Asi 25 mg práškované drogy (180) se smíchá v kuželové baňce s 50 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe se 40 ml *etheru R*. Vrchní vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*. 5 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha. Odparek se po vychladnutí smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1;* vzniká žluté nebo oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vzniká červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 9,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před přímým světlem.

0,150 g práškované drogy (180) se smíchá ve 100ml baňce se 30,0 ml *vody R*. Baňka se zváží a pak se zahřívá 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zváží, a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost *vodou R*. Odstřeďuje se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepe se třikrát 15 ml *chloroformu R*. Spodní vrstva se vždy odstraní. K vrchní vrstvě se přidá s 0,10 g *hydrogenuhličitanu sodného R*, 3 min se protřepává, pak se odstřeďuje. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100ml baňky s kulatým dnem a se zábrusem, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a promíchá se. Směs se zahřívá 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a znovu se zahřívá 20 min za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml *etheru R*, etherem se vždy nejprve propláchne baňka. Spojené etherové výtřepky se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*, převedou se do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B $C_{42}H_{38}O_{20}$, podle vzorce:

$$\frac{A \ . \ 1{,}25}{m} ,$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,
m - navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance sennosidu B je 240.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

Sennae fructus angustifoliae

1998

Plod kasie úzkolisté

Synonyma. Sennový plod, Sennae foliculus

Je to usušený plod druhu *Cassia angustifolia* VAHL, známého jako Tinnevelly senna.

Obsahuje nejméně 2,2 % hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako sennosid B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; M_r 863), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga slabého pachu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Ploché, nevýrazně ledvinité lusky, žlutohnědé až hnědé, s tmavě hnědými skvrnami odpovídajícími poloze semen, zpravidla 35 mm až 60 mm dlouhé a 14 mm až 18 mm široké. Jsou výrazně zašpičatělé, krátce stopkaté. Lusky obsahují pět až osm plochých, opak vejčitých semen, zelených až světle hnědých, na osemení s nesouvislými, vlnitými, příčnými žebry.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je hnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: oplodí s mnohohrannými buňkami a malým počtem kuželovitých, na povrchu bradavčitých chlupů a občas i anomocytickými nebo paracytickými průduchy (*2.8.3*); dvě vrstvy zkřížených vláken obklopené vrstvou komůrkových vláken s krystaly šťavelanu vápenatého; charakteristické palisádové buňky semene a vrstevnaté buňky endospermu; drúzy a krystaly šťavelanu vápenatého.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (180) se zahřeje k varu s 5 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R.* Směs se odstřeďuje a použije se supernatantní tekutina. *Porovnávací roztok.* 10 mg *Sennae extractum CRL* se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů *lihu 96% R* a *vody R* (roztok obsahuje malý sediment).

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 2 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (1 + 30 + 40 + 40) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *kyseliny dusičné R* 20% *(V/V)* a zahřívá se 10 min při 120 °C, po vychladnutí se stříká roztokem *hydroxidu draselného R* (50 g/l) v *lihu R* 50% (*V/V*) do objevení skvrn. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (v pořadí stoupajících hodnot R_F až do střední části chromatogramu - sennosidy B, A, D a C), zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnami sennosidu D a C může být patrna červená skvrna rhein-8-glukosidu. Skvrny odpovídající sennosidu D a C jsou na chromatogramu zkoušeného roztoku zbarveny slabě.

D. Asi 25 mg práškované drogy (180) se smíchá v kuželové baňce s 50 ml *vody R* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 15 min ve vodní lázni. Po ochlazení se protřepe se 40 ml *etheru R.* Vrchní vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R.* 5 ml tohoto roztoku

se odpaří do sucha. Odparek se po vychladnutí smíchá s 5 ml *amoniaku zředěného RS1;* vzniká žluté až oranžové zbarvení. Zahřívá se 2 min na vodní lázni; vznikne červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při teplotě 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 9,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před přímým světlem.

0,150 g práškované drogy (180) se smíchá ve 100ml baňce se 30,0 ml *vody R*. Baňka se zváží a pak se zahřívá 15 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zváží, a je-li třeba, doplní se na původní hmotnost *vodou R*. Odstřeďuje se a 20,0 ml supernatantní tekutiny se převede do dělicí nálevky na 150 ml. Přidá se 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a protřepe se třikrát 15 ml *chloroformu R*. Spodní vrstva se vždy odstraní. K vrchní vrstvě se přidá 0,10 g *hydrogenuhličitanu sodného R*, 3 min se protřepává, pak se odstřeďuje. 10,0 ml supernatantní tekutiny se převede do 100 ml baňky s kulatým dnem a se zábrusem, přidá se 20 ml *chloridu železitého RS1* a promíchá se. Směs se zahřívá 20 min ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu roztoku v baňce. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a znovu se zahřívá 20 min za častého protřepávání až do rozpuštění sraženiny. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a protřepe se třikrát 25 ml *etheru R*, etherem se vždy nejprve propláchne baňka. Spojené etherové výtřepky se promyjí dvakrát 15 ml *vody R*, převedou se do odměrné baňky a zředí se *etherem R* na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Změří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 515 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah hydroxyanthracenových derivátů v procentech, vyjádřeno jako sennosid B $C_{20}H_{38}O_{20}$, podle vzorce:

$$\frac{A \ . \ 1{,}25}{m} ,$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 515 nm,
m - navážku drogy v gramech.

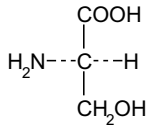
Specifická absorbance sennosidu B je 240.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

Serinum

Serin



$C_3H_7NO_3$ M_r 105,09 CAS 56-45-1

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-hydroxypropionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_3H_7NO_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *serinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 1 ml roztoku zkoušené látky (10 g/l) ve zkumavce se přidá 5 ml roztoku *jodistanu sodného R* (20 g/l), zahřívá se na vodní lázni a páry se zachytávají do skleněné vaty navlhčené *vodou R* a vložené do otevřené zkumavky. Po 5 min zahřívání se skleněná vata přenese do zkumavky obsahující 1 ml roztoku *kyseliny chromotropové sodné soli R* (15 g/l) a 3 ml *kyseliny sírové R* a 10 min se zahřívá na vodní lázni; vznikne fialově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +14,0° až +16,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,50 g v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *serinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *methioninu CRL* a 10 mg *serinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se komůrka tvořená dvěma hodinovými sklíčky o průměru 60 mm položenými hranami na sebe. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí *papír lakmusový červený R* o velikosti 5 x 5 mm a zvlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní hodinové sklíčko a rozpustí se v 0,5 ml *vody R*. K roztoku se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s lakmusovým papírem se přiklopí na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá se 15 min při 40 °C. Papír lakmusový není intenzivněji modře zabarven než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědavě žlutého zbarvení na zelené.

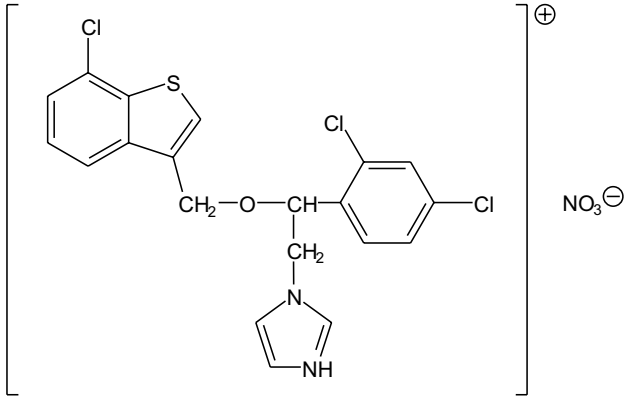
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 10,51 mg $C_3H_7NO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Sertaconazoli nitras

Sertakonazoliumnitrat



$C_{20}H_{16}Cl_3N_3O_4S$ M_r 500,78 CAS 99592-32-2

Je to (*RS*)-1-{2-[(7-chlor-1-benzothiofen-3-yl)methoxy]-2-(2,4-dichlorfenyl)ethyl}-1*H*-imidazoliumnitrat. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{16}Cl_3N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 156 °C až 161 °C.

B. 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 240 nm až 320 nm; roztok vykazuje tři absorpční maxima, při 260 nm, 293 nm a 302 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 302 nm k absorbanci naměřené v maximu při 293 nm je 1,16 až 1,28.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sertakonazoliumnitratu CRL*. Tablety se připraví z látek sušených 2 h při 100 °C až 105 °C a z *bromidu draselného R*.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *sertakonazoliumnitratu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (1 + 9) a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *mikonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *toluenu R a dioxanu R* (1 + 40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 15 min v proudu vzduchu a pak se vloží na 30 min do komory nasycené parami jodu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

E. Asi 1 mg vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29).*

Zkoušený roztok. 10,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 mg *sertakonazoliumnitratu CRL* a 5,0 mg *mikonazoliumnitratu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem nitrilovaným pro chromatografii R1* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (1,5 g/l) (37 + 63), s průtokovou rychlostí 1,6 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a) a 20 μl porovnávacího roztoku (b). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: nitrátového iontu asi 1 min, mikonazolu asi 17 min, sertakonazolu asi 19 min. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 25 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je rozlišení mezi píky mikonazolu a sertakonazolu nejméně 2,0.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,3násobku retenčního času hlavního píku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího nitrátovému iontu, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %); součet ploch všech takových píků není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 0,2násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml směsi ze stejných objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R* a *2-butanonu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Provede se slepá zkouška.

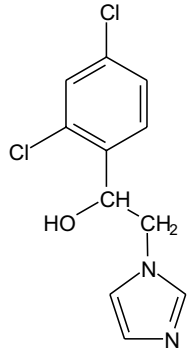
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 50,08 mg $C_{20}H_{16}Cl_3N_3O_4S$.

Uchovávání

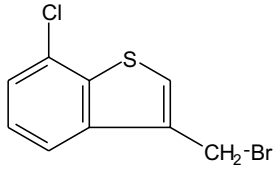
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

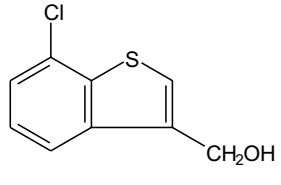
Nečistoty



A. 1-(2,4-dichlorfenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethanol,



B. 3-(brommethyl)-7-chlor-1-benzothiofen,



C. (7-chlor-1-benzothiofen-3-yl)methanol.

Sesami oleum

1998

Sezamový olej

Synonymum. Oleum sesami

CAS 8008-74-0

Je to olej získaný ze zralých semen druhu *Sesamum indicum* L. lisováním nebo extrakcí a následným čištěním. Zbarvení a pach mohou být zlepšeny dalším čištěním. Olej může obsahovat vhodný antioxidant.

Vlastnosti

Čirá slabě žlutá kapalina, zpravidla bez pachu. Je prakticky nerozpustný v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým.

Relativní hustota je asi 0,919.

Tuhne při teplotě asi -4 °C na měkkou hmotu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A a B, viz Obecné zásady (1.2).

A. Index lomu, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Provede se zkouška Totožnost mastných olejů tenkovrstvou chromatografií *(2.3.2)*. Chromatogram zkoušeného roztoku odpovídá charakteristickému chromatogramu pro sezamový olej.

C. Zkouška Složení triacylglycerolů, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Index lomu *(2.2.6)*. 1,470 až 1,476.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 0,6; stanoví se s 10,0 g zkoušené látky. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, je číslo kyselosti nejvýše 0,3.

Číslo peroxidové *(2.5.5).* Nejvýše 10,0. Pokud je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, je číslo peroxidové nejvýše 5,0.

Nezmýdelnitelný podíl *(2.5.7)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Zásaditě reagující látky *(2.4.19)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Zásaditě reagující látky v mastných olejích.

Bavlníkový olej. 5 ml zkoušené látky se smíchá ve zkumavce s 5 ml směsi stejných objemových dílů *pentanolu R* a roztoku *síry R* (10 g/l) v *sirouhlíku R.* Směs se opatrně zahřívá až do odstranění sirouhlíku, pak se dolní třetina zkumavky ponoří do vroucího nasyceného roztoku *chloridu sodného R;* do 15 min nevznikne červené zbarvení.

Složení triacylglycerolů. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29).*

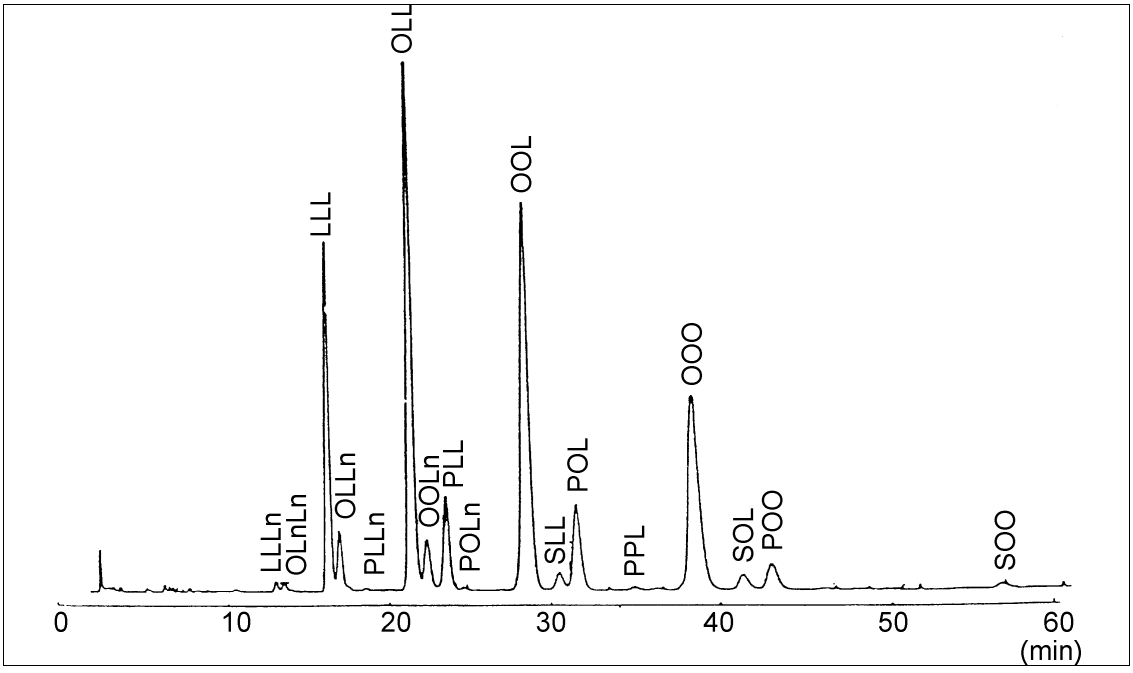
Zkoušený roztok. 0,200 g se v odměrné baňce zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- dvou nerezových ocelových kolon délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněných *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm) v sérii,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *dichlormethanu R* a *acetonitrilu R* (1 + 2), při průtokové rychlosti 1,0 ml/min,
- refraktometrického detektoru.

Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a určí se píky na chromatogramu. Radikály mastných kyselin jsou označeny jako linolenový (Ln), linolový (L), olejový (O), palmitový (P) a stearový (S).

Obsah triacylglycerolů v procentech se vypočítá z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku metodou vnitřní normalizace.

Složení triacylglycerolů je následující:
- LLL: 7,0 % až 19,0 %,
- OLL: 13,0 % až 30,0 %,
- PLL: 5,0 % až 9,0 %,
- OOL: 14,0 % až 25,0 %,
- POL: 8,0 % až 16,0 %,
- OOO: 5,0 % až 14,0 %,
- SOL: 2,0 % až 8,0 %,
- POO: 2,0 % až 10,0 %.



Obr. 1. Vzorový chromatogram pro zkoušku Složení triacylglycerolů

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Pokud je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, obsahuje nejvýše 0,05 % vody; stanoví se s 5,000 g zkoušené látky.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Pokud je látka určena k výrobě parenterálních lékových forem, uchovává se ve vzduchotěsných obalech pod inertním plynem.

Byl-li obal otevřen, jeho obsah má být použit v co nejkratší době. Nepoužitá část obsahu se uchovává v atmosféře inertního plynu.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka vhodná pro parenterální použití,
- název a koncentrace přidaného antioxidantu.
- název použitého inertního plynu.

Silica colloidalis anhydrica

Koloidní bezvodý oxid křemičitý

Synonyma. Silicium dioxydatum colloidale, oxid křemičitý koloidní

SiO_2 M_r 60,08 CAS 7631-86-9

Počítáno na vyžíhanou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny SiO_2.

Vlastnosti

Bílý lehký jemný amorfní prášek s velikostí částic asi 15 nm. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v minerálních kyselinách, s výjimkou kyseliny fluorovodíkové. Rozpouští se v horkých roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Asi 20 mg vyhovuje zkoušce na křemičitany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 5,5; měří se suspenze připravená třepáním 1,0 g s 30 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Chloridy *(2.4.4)*. K 1,0 g se přidá směs 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 30 ml *vody R,* 15 min se zahřívá na vodní lázni za občasného zamíchání a zředí se *vodou R* na 50 ml, je-li třeba, zfiltruje se a ochladí. 10 ml filtrátu zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (250 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 2,5 g se přidá dostatečné množství *vody R*, aby vznikla polotuhá hmota, a vysuší se při 140 °C. Když je sušená látka bílá, rozdrtí se hmota skleněnou tyčinkou, přidá se 25 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a 5 min se mírně vaří za občasného promíchání skleněnou tyčinkou. 20 min se odstřeďuje a supernatantní kapalina se zfiltruje přes membránový

filtr. Ke zbytku v centrifugační zkumavce se přidají 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 9 ml *vody R* a povaří se. Potom se opět odstřeďuje 20 min a supernatantní kapalina se zfiltruje přes stejný membránový filtr. Zbytek se promyje malým množstvím *vody R*, filtráty a promývací kapalina se spojí a zředí se *vodou R* na 50 ml. K 20 ml tohoto roztoku se přidá 50 mg *kyseliny askorbové R* a 1 ml *amoniaku 26% R,* zneutralizuje se *amoniakem zředěným RS2* a zředí se *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (25 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta žíháním. Nejvýše 5,0 %; 0,200 g se 2 h žíhá v platinovém kelímku při 900 °C. Před vážením se nechá vychladnout v exsikátoru.

Stanovení obsahu

Ke zbytku získanému ve zkoušce Ztráta žíháním se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R* a množství *lihu 96% R* potřebné k úplnému zvlhčení zbytku. Přidá se 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R* a odpaří se do sucha při 95 °C až 105 °C opatrně, aby se zabránilo ztrátám prskáním. Stěny misky se opláchnou 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R*, znovu se odpaří do sucha, žíhá se při 900 °C, ochladí se v exsikátoru a zváží se. Rozdíl mezi hmotností konečného zbytku a hmotností zbytku získaného ve zkoušce Ztráta žíháním odpovídá hmotnosti SiO_2 v použitém množství zkoušeného vzorku.

Silica colloidalis hydrica

Koloidní hydratovaný oxid křemičitý

$SiO_2 . xH_2O$ M_r bezvodého 60,08 CAS 63231-67-4

Počítáno na vyžíhanou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny SiO_2.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý lehký jemný amorfní prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v minerálních kyselinách, s výjimkou kyseliny fluorovodíkové. Rozpouští se v horkých roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce na křemičitany *(2.3.1)*.

B. Zahřívá se 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C; úbytek hmotnosti je větší než 3 %.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 2,5 g se přidá 50 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, promíchá se, zahřívá se 30 min na vodní lázni za občasného zamíchání. Na původní objem se doplní *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS*. Odpaří se do sucha. Ke zbytku se přidá směs 8 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 24 ml *vody R*, zahřeje se k varu a filtruje se za sníženého tlaku přes filtr ze slinutého skla (16). Zbytek na filtru se promyje horkou směsí 3 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a

9 ml *vody R* a malými množstvími *vody R.* Filtrát a promývací tekutiny se spojí a zředí se *vodou R* na 50 ml.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 7,0; měří se suspenze připravená smícháním 1,0 g se 30 ml roztoku *chloridu draselného R* (75 g/l).

Absorpční mohutnost. K 5 g v třecí misce se přidává po kapkách za stálého míchání 5 ml *vody R;* směs zůstane práškem.

Látky rozpustné v kyselině chlorovodíkové. 10,0 ml roztoku S se odpaří v platinové misce a vysuší se při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti; hmotnost zbytku je nejvýše 10 mg (2,0 %).

Chloridy *(2.4.4)*. K 0,5 g se přidá 50 ml *vody R,* 15 min se zahřívá na vodní lázni a zředí se *vodou R* na 100 ml. Odstřeďuje se 5 min při 1500 g_n, 10 ml supernatantní kapaliny zředěné *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (0,1 %).

Sírany *(2.4.13)*. 2 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 100 ml. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (1 %).

Železo (*2.4.9*). K 2 ml roztoku S se přidá 28 ml *vody R.* 10 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na železo (300 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. K 20 ml roztoku S se přidá 50 mg *hydroxylamoniumchloridu R* a 1 ml *amoniaku 26% R.* Hodnota pH se upraví *amoniakem zředěným RS2* na 3,5 za potenciometrické kontroly a zředí se *vodou R* na 25 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (25 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml).*

Ztráta žíháním. Nejvýše 20,0 %; 0,200 g se 1 h zahřívá v platinovém kelímku při 100 °C až 105 °C a potom se žíhá 2 h při 900 °C.

Stanovení obsahu

Ke zbytku získanému ve zkoušce Ztráta žíháním se přidá 0,2 ml *kyseliny sírové R* a množství *lihu 96% R* potřebné k úplnému zvlhčení zbytku. Přidá se 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R* a odpaří se do sucha při 95 °C až 105 °C opatrně, aby se zabránilo ztrátám prskáním. Stěny misky se opláchnou 6 ml *kyseliny fluorovodíkové R,* znovu se odpaří do sucha, žíhá se při 900 °C, ochladí se v exsikátoru a zváží se. Rozdíl mezi hmotností konečného zbytku a hmotností zbytku získaného ve zkoušce Ztráta žíháním odpovídá hmotnosti SiO_2 v množství použitého zkoušeného vzorku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Sinapis etheroleum artificiale

N

Umělá hořčičná silice

Synonyma. Sinapis aetheroleum artificiale, Oleum sinapis artificiale

CAS 57-06-7

Je to allylester kyseliny iso-thiokyanaté.
Obsahuje nejméně 94,0 % allylisothiokyanatu (C_4H_5NS; M_r 99,15).

Vlastnosti

Bezbarvá až nažloutlá čirá kapalina, charakteristického pachu, silně dráždící k slzení. Je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v lihu 96%. Je opticky inaktivní.

Zkoušky totožnosti

0,1 ml se rozpustí v 1 ml *lihu 96% R*, přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2* a mírně se zahřeje; vznikne černá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Relativní hustota (*2.2.5*). 1,016 až 1,021.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,526 až 1,530.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná v jedné polovině objemového dílu *lihu R* 90% *(V/V)*.

Fenoly. 1 ml se rozpustí v 6 ml *lihu R* 90% *(V/V)*, po přidání 0,05 ml *chloridu železitého RS1* nevznikne modravé zbarvení.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 75,00 mg *nonanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Zkoušený roztok. 75,00 mg se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml se smíchají s 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 75,00 mg *allylisothiokyanatu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml se smíchají s 1,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony délky 60 m a vnitřního průměru 0,53 mm se stěnou pokrytou *poly[fenyl(5)-methyl(95)]siloxanem R* o tloušťce vrstvy 1,5 μm,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 10 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se zvyšuje ze 60 °C rychlostí 3 °C/min až na 100 °C,
- teploty nástřikového prostoru a detektoru 220 °C.

Nastříkne se odděleně po 0,5 μl zkoušeného a porovnávacího roztoku. Opakuje se nejméně třikrát. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: nonanu asi 9,5 min a allylisothiokyanatu asi 15 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže symetrie píku je nejméně

0,8 a nejvýše 1,2, počítáno pro pík allylisothiokyanatu, a rozlišení dvou po sobě následujících píků je nejméně 1,5.

Obsah allylisothiokyanatu v procentech se stanoví metodou vnitřního standardu.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

Solani amylum

1998

Bramborový škrob

Synonymum. Amylum solani

CAS 9005-25-8

Je to škrob získaný z hlíz druhu *Solanum tuberosum* L.

Vlastnosti

Velmi jemný bílý prášek, vrzající mezi prsty. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě a v lihu 96%. Neobsahuje škrobová zrna jiných rostlinných druhů. Může obsahovat malé množství úlomků tkání matečné rostliny.

Zkoušky totožnosti

A. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu R* a *vody R.* Škrobová zrna jsou nepravidelného tvaru, vejčitá nebo hruškovitá, 30 μm až 100 μm velká nebo kulovitá o průměru 10 μm až 35 μm. Občas se vyskytují složená, dvojčetná až čtyřčetná zrna. Vejčitá a hruškovitá zrna mají mimostředové hilum, kulovitá zrna středové nebo mírně mimostředové hilum. Všechna zrna jsou zřetelně koncentricky vrstvená. V polarizovaném světle je patrný intenzivní černý kříž protínající hilum.

B. 1 g se suspenduje v 50 ml *vody R*, vaří se 1 min a pak se ochladí; vznikne hustý, opalizující sliz.

C. K 1 ml slizu ze zkoušky totožnosti B se přidá 0,05 ml *jodu RS1;* vznikne tmavě modré zbarvení, které po zahřátí zmizí a po ochlazení se opět objeví.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 8,0; měří se následující roztok: 5,0 g se 60 s protřepává s 25,0 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a pak se nechá 15 min stát.

Železo *(2.4.9)*. 1,5 g se protřepe s 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných dílů *glycerolu R* a *vody R;* nejsou přítomny stopy buněčných stěn a zbytků cytoplazmatu.

Celkové bílkoviny. Nejvýše 0,1 % (odpovídá 0,017 % N_2, přepočítávací faktor je 5,7). Stanoví se se 6,00 g mineralizací s kyselinou sírovou (*2.5.9*) s následující modifikací: částice ulpělé na hrdle baňky se spláchnou 25 ml *kyseliny sírové R*, směs se zahřívá tak dlouho, až je roztok čirý; použije se 45 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

Oxidační látky *(2.5.30)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Oxidanty.

Oxid siřičitý *(2.5.29)*. Nejvýše 50 μg/g.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^3 bakterií a nejvýše 10^2 hub v gramu; stanoví se plotnovou metodou *(2.6.12)*. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 20,0 %; 1,000 g se suší 90 min v sušárně při 130 °C.

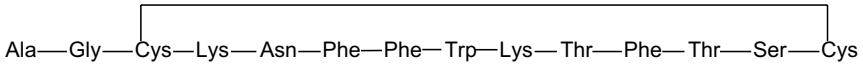
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,6 %; stanoví se s 1,00 g.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Somatostatinum

Somatostatin



$C_{76}H_{104}N_{18}O_{19}S_2$ M_r 1637,89 CAS 38916-34-6

Je to cyklický tetradekapeptid se strukturou hormonu hypothalamu, který inhibuje uvolnění lidského růstového hormonu. Získává se chemickou syntézou. Obsahuje proměnlivé množství kyseliny octové. Je k dispozici v lyofilizované formě a počítáno na bezvodou, kyseliny octové prostou látku, obsahuje 95,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{76}H_{104}N_{18}O_{19}S_2$.

Vlastnosti

Bílý amorfní prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a kyselině octové, prakticky nerozpustný v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 1,0 mg se rozpustí v 1,0 ml *vody R*.

Porovnávací roztok. Obsah lahvičky *somatostatinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se vhodným objemem této *vody R* tak, aby se získala konečná koncentrace 1 mg/ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové R*, *pyridinu R*, *vody R* a *1-butanolu R* (10 + 15 + 20 + 45) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, postříká roztokem *ninhydrinu R* (1 g/l) a zahřívá se

5 min v sušárně při 110 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -37° až -47°, počítáno na látku bezvodou a prostou kyseliny octové. Měří se roztok připravený rozpuštěním 2,0 mg v 1,0 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 1% (*V/V*).

Absorbance (*2.2.25*). 5,0 mg se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a zředí se stejným roztokem na 100,0 ml. Absorbance měřená v maximu při 280 nm je nejvýše 0,20, počítáno na obsah látky ze zkoušky Stanovení obsahu.

Aminokyseliny. Stanoví se analyzátorem aminokyselin za použití *norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se kalibruje směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a následujících L-aminokyselin:

lysin	threonin	alanin	leucin
histidin	serin	valin	tyrosin
arginin	kyselina glutamová	methionin	fenylalanin
kyselina asparagová	prolin	isoleucin	

spolu s polovinou ekvimolárního množství L-cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 30 mg *DL-norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 1,0 mg se naváží do pečlivě vymyté silnostěnné zkumavky délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Přidá se přesně odměřený objem roztoku vnitřního standardu obsahující takové množství *DL-norleucinu R*, které odpovídá asi polovině předpokládaného počtu molů somatostatinu. Zkumavka se vloží do chladicí směsi při -5 °C, vytvoří se podtlak nepřevyšující 133 Pa a těsně se uzavře. Poté se 16 h zahřívá na 110 °C až 115 °C. Zkumavka se po ochlazení otevře a její obsah se převede do vhodné 10ml baňky pomocí pěti dávek *vody R* po 0,2 ml. Za sníženého tlaku se odpaří do sucha nad *hydroxidem draselným R*. Zbytek se rozpustí ve *vodě R* a znovu se vysuší nad *hydroxidem draselným R* za sníženého tlaku; postup se opakuje ještě jednou. Zbytek po odpaření se rozpustí ve vhodném tlumivém roztoku (pH 2,2) a zředí se na vhodný objem stejným tlumivým roztokem.

Do analyzátoru aminokyselin se přesně odměří vhodný objem zkoušeného roztoku tak, aby pík odpovídající aminokyselině s největším obsahem obsáhl větší část záznamu zapisovače.

Obsah každé aminokyseliny se vyjádří v molech. Vypočítá se relativní zastoupení aminokyselin tak, že jedna osmina součtu molů kyseliny asparagové, alaninu, lysinu, glycinu a fenylalaninu se rovná 1. Hodnoty pro jednotlivé aminokyseliny jsou v těchto rozmezích: kyselina asparagová 0,95-1,05; glycin 0,95-1,05; alanin 0,95-1,05; fenylalanin 2,85-3,15; serin 0,7-1,05; threonin 1,4-2,1; polovina cystinu 1,4-2,1; lysin 1,9-2,1. Ostatní aminokyseliny jsou jen ve stopách.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže nalezený počet molů norleucinu se po opravě na množství použitého roztoku neliší o více než ±5 % od množství vzatého k hydrolýze.

Příbuzné peptidy. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 1,5 mg se rozpustí ve 3,0 ml *vody R*.

Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se přidá k 1,0 ml *vody R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 50 mm a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min při tomto elučním programu:
  - *mobilní fáze A* - 11 ml *kyseliny fosforečné R* se zředí *vodou R*, pH se upraví *triethylaminem R* na hodnotu 2,3 a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* - *acetonitril R*,

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámka
0 - 18	79 → 60	21 → 40	lineární gradient
18 - 20	60	40	izokraticky
20 - 21	60 → 79	40 → 21	lineární gradient
21 - 26	79	21	ustalování

- spektrofotometrického detektoru, 215 nm.

Kolona se ustaluje směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (21 + 79).

Nastříkne se po 50 µl každého roztoku.

Nastříkne se třikrát porovnávací roztok (a); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku není větší než 2,5 %.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %); součet ploch těchto píků není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,0 %). Nepřihlíží se k žádnému píku rozpouštědel.

Kyselina octová. Nejvýše 15,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *kyseliny propionové R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1 ml *kyseliny propionové R* se zředí roztokem *kyseliny mravenčí bezvodé R* 1% na 100 ml.
Zkoušený roztok. 0,500 mg se rozpustí ve *vodě R*, přidá se 50 µl roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 1,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 ml *kyseliny octové R* se zředí roztokem *kyseliny mravenčí bezvodé R* 1% na 100 ml. K 25 µl takto připraveného roztoku se přidá 50 µl roztoku vnitřního standardu a zředí se *vodou R* na 1,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *uhlím pro chromatografii grafitizovaným R,* impregnovaným 0,3 % *makrogolu 20 000 R* a roztokem *kyseliny fosforečné R* 1%,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 130 °C, detektoru 200 °C a nástřikového prostoru 170 °C. Nastříkne se odděleně 1,0 µl až 2,0 µl zkoušeného a porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 8,0 %; stanoví se s 10,00 mg zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříknou 2 ml roztoku zkoušené látky (0,04 g/l) ve *vodě na injekci R*.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 5,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok. Obsah lavičky *somatostatinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se vhodným objemem této vody tak, aby se získala konečná koncentrace 0,05 mg/ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 50 mm a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (25 + 75), s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min:
  - *mobilní fáze A* - 11 ml *kyseliny fosforečné R* se zředí *vodou R*, pH se upraví *triethylaminem R* na 2,3 a zředí se *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* - *acetonitril R*,
- spektrofotometrického detektoru, 215 nm.

Kolona se ustaluje směsí objemových dílů mobilní fáze B a mobilní fáze A (25 + 75).

Nastříkne se třikrát porovnávací roztok; zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku je nejvýše 2,5 %.

Nastříkne se po 50 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a 15 min se zaznamenávají chromatogramy.

Obsah somatostatinu ($C_{76}H_{104}N_{18}O_{19}S_2$) se vypočítá z plochy píků na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku a deklarovaného obsahu $C_{76}H_{104}N_{18}O_{19}S_2$ v *somatostatinu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem a vlhkostí, při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka sterilní.

† Somatropini solutio ad praeparationem

Koncentrovaný roztok somatropinu

Je to roztok obsahující bílkovinu se strukturou (191 aminokyselinových zbytků) hlavní složky růstového hormonu produkovaného lidskou hypofýzou. Může obsahovat tlumivé soli a jiné pomocné látky. Obsahuje 91,0 % až 105,0 % deklarovaného obsahu somatropinu[1] ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$). Vyhovuje požadavkům článku *Producta ab ADN recombinante*.

Výroba

Připravuje se biotechnologicky metodou založenou na rekombinaci DNK (rDNK). Při vývoji přípravku se prokáže vhodnou validovanou metodou stanovení biologické účinnosti, založenou na stimulaci růstu a schválenou oprávněnou autoritou, že látka získaná daným výrobním postupem má biologickou účinnost nejméně 2,5 m.j. v miligramu.

Před propuštěním se na každé šarži provedou následující zkoušky, pokud oprávněná autorita neudělí výjimku.

Bílkoviny hostitelské buňky. Požadavek stanoví oprávněná autorita.

DNK hostitelské buňky a vektoru. Požadavek stanoví oprávněná autorita.

Vlastnosti

Čirý nebo slabě opalizující, bezbarvý roztok.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se elektroforeogramy ze zkoušky Izoelektrická fokusace. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá hlavní zóna polohou hlavní zóně na elektroforeogramu porovnávacího roztoku. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (c) je pouze jedna hlavní zóna.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné bílkoviny, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Provede se peptidové mapování.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *tlumivým roztokem trisacetatovým o pH 8,5* tak, aby obsahoval 2,0 mg somatropinu v mililitru. Asi 1,0 ml takto připraveného roztoku se přenese do zkumavky z vhodného materiálu, např. polypropylenu. Připraví se čerstvý roztok *trypsinu pro peptidové mapování R* (1 g/l) ve vhodném tlumivém octanovém roztoku o pH asi 5,0 a 30 µl se přidá k roztoku zkoušené látky. Zkumavka se uzavře a vloží se na 4 h do vodní lázně 37 °C teplé. Potom se zkumavka vyjme z vodní lázně a ihned se probíhající reakce přeruší přidáním 200 µl *kyseliny octové ledové R*.

[1] 1 mg bezvodého somatropinu ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) odpovídá 3,0 m.j. biologické účinnosti.

Porovnávací roztok. Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trisacetatovém o pH 8,5* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu, a dále se pokračuje současně a za stejných podmínek jako u zkoušeného roztoku.

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí mobilní fáze A a mobilní fáze B, které se připraví následujícím způsobem: 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* se zředí *vodou R* na 1000 ml (mobilní fáze A). Ke 100 ml *vody R* se přidá 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* a zředí se *acetonitrilem R* na 1000 ml (mobilní fáze B). Průtoková rychlost je 1 ml/min. Použije se následující gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0	100	0
20	80	20
40	75	25
65	50	50

- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Kolona se nejméně 15 min ustaluje mobilní fází A. Potom se kolona promývá za použití výše uvedeného gradientu a pokračuje se s promýváním po dobu 5 min s průběžně se zvyšující koncentrací mobilní fáze B až na 80 %. Potom se kolona opět ustaluje mobilní fází A po dobu 15 min. Nastříkne se odděleně po 100 μl každého roztoku. Na konci gradientové eluce a před dalším nástřikem se zvýší koncentrace mobilní fáze B na 80 % v průběhu 5 min a poté se kolona 15 min ustaluje mobilní fází A.

Chromatogram zkoušeného roztoku odpovídá chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogramy jednotlivých roztoků kvalitativně odpovídají porovnávacímu chromatogramu dodávanému se *somatropinem CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). Zkoušený přípravek se zředí *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.

Zkoušený roztok (b). 100 μl zkoušeného roztoku (a) se zředí *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,5 (1)* na 2,0 ml.

Porovnávací roztok (a). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.

Porovnávací roztok (b). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu. K takto připravenému roztoku se přidá čerstvě připravený koncentrovaný roztok *peroxidu vodíku R* tak, aby bylo dosaženo výsledné

koncentrace 0,01 % (*V/V*), a nechá se 5 h stát při 4 °C. Potom se na mililitr roztoku přidá 4,5 mg *L-methioninu R*.

Roztoky se uchovávají při teplotě 2 °C až 8 °C a použijí se do 24 h. Pokud se používá automatický dávkovač, je nutno jej udržovat při 2 °C až 8 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem butylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *propanolu R* a *tlumivého roztoku trometamolového o pH 7,5 (1)* (29 + 71), s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Teplota kolony se udržuje při 45 °C.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Je-li třeba, upraví se koncentrace propanolu v mobilní fázi tak, aby retenční čas hlavního píku byl (33 ± 3) min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Určí se píky pomocí porovnávacího chromatogramu dodávaného se *somatropinem CRL*. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi somatropinem a jeho oxidačním produktem je nejméně 1,0.

Nastříkne se po 20 μl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu nejméně 50 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a): plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (5,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (10,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel.

Dimer a příbuzné látky s vyšší molekulovou hmotností. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*), jak je popsána ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (a). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na získaném chromatogramu dosahovala 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače. Rozlišení dané poměrem výšky minima mezi píky monomeru a dimeru k výšce píku dimeru je menší než 0,6 (retenční časy vztažené k monomeru jsou přibližně 0,94 pro dimer a 0,87 pro polymery). Několikrát se nastříkne porovnávací roztok (a) (nejméně třikrát); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku je menší než 2,5 %.

Nastříkne se po 50 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků s retenčním časem menším, než je retenční čas hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (4,0 %).

Izoelektrická fokusace. Provede se izoelektrická fokusace.

Zkoušený roztok (a). Je-li třeba, zkoušený přípravek se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.

Zkoušený roztok (b). 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) na 2,0 ml.

Zkoušený roztok (c). Smíchá se 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) a 0,1 ml porovnávacího roztoku.

Porovnávací roztok. Připraví se roztok *somatropinu CRL* ve *vodě R* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg.

Roztok pro kalibraci izoelektrického bodu o rozmezí pH 2,5 až 6,5. Připraví se a použije podle návodu výrobce.

Se zařízením se pracuje podle návodu výrobce. Izoelektrická fokusace se provádí na hotových deskách s vrstvou gelu o rozměrech 245 mm x 110 mm x 1 mm a pH v rozmezí 4,0 až 6,5. Na vrstvu gelu se nanese odděleně po 15 μl každého roztoku. Jako anodický roztok se použije roztok

kyseliny glutamové R (147,1 g/l) v roztoku *kyseliny fosforečné R* (50 g H_3PO_4/l) a jako katodický roztok se použije roztok *ß-alaninu R* (89,1 g/l). Pracovní podmínky se nastaví na 2000 V a 25 mA. Nechá se proběhnout fokusace při konstantním napětí po dobu 2,5 h. Vrstva gelu se ponoří na 30 min do roztoku obsahujícího *kyselinu trichloroctovou R* (115 g/l) a *kyselinu sulfosalicylovou R* (34,5 g/l) a potom na 5 min do směsi objemových dílů *kyseliny octové R*, *ethanolu R* a deionizované *vody R* (8 + 25 + 67) (odbarvovací roztok). Vrstva gelu se vybarvuje ponořením na 10 min do roztoku *modře kyselé 83 R* (1,15 g/l) v odbarvovacím roztoku zahřátého na 60 °C a potom se ponoří do odbarvovacího roztoku do odstranění nadbytku barviva. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozdělení zón roztoku pro kalibraci izoelektrického bodu odpovídá požadavkům výrobce. Na elektroforeogramu porovnávacího roztoku je viditelná hlavní zóna s izoelektrickým bodem okolo 5 a kyselejší menší zóna okolo 4,8. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) žádná zóna, kromě hlavní zóny, nepřevyšuje svou intenzitou hlavní zónu na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (b) (5,0 %).

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je přípravek určen k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanoví se vylučovací chromatografií (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zkoušený přípravek se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 1,0 mg somatropinu.
Porovnávací roztok (a). 200 µl zkoušeného roztoku se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 1,0 mg somatropinu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 9,4 mm naplněné *silikagelem hydrofilním pro chromatografii R* jakosti vhodné pro dělení globulárních bílkovin v rozmezí molekulové hmotnosti 5000 až 60 000.
- mobilní fáze, kterou je zfiltrovaný a odplyněný roztok *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l), s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (b). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku dosahovala nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Několikrát se nastříkne porovnávací roztok (b) (nejméně třikrát); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy píku somatropinu je nejvýše 2,5 %. Nastřikuje se střídavě po 50 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b).

Obsah somatropinu se vypočítá z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) a deklarovaného obsahu látky $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ v *somatropinu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě -20 °C. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazení a rozmrazení roztoku. Je-li roztok sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- obsah somatropinu v miligramech v mililitru roztoku,
- název a množství jakýchkoliv pomocných látek,
- zda je roztok sterilní,
- zda je roztok prostý bakteriálních endotoxinů.

† Somatropinum

Somatropin

$C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ M_r 22124,96 CAS 12629-01-5

Je to bílkovina se strukturou (191 aminokyselinových zbytků) hlavní složky růstového hormonu produkovaného lidskou hypofýzou. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 91,0 % až 105,0 % somatropinu[2)] ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$). Vyhovuje požadavkům článku *Producta ab ADN recombinante*.

Výroba

Připravuje se biotechnologicky metodou založenou na rekombinaci DNK (rDNK). Při vývoji přípravku se vhodnou validovanou metodou stanovení biologické účinnosti založenou na stimulaci růstu a schválenou oprávněnou autoritou prokáže, že látka získaná daným výrobním postupem má biologickou účinnost nejméně 2,5 m.j. v miligramu.

Před propuštěním se na každé šarži provedou následující zkoušky, pokud oprávněná autorita neudělí výjimku.

Bílkoviny hostitelské buňky. Požadavek stanoví oprávněná autorita.

DNK hostitelské buňky a vektoru. Požadavek stanoví oprávněná autorita.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek.

---

2) 1 mg bezvodého somatropinu ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) odpovídá 3,0 m.j. biologické účinnosti.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se elektroforeogramy ze zkoušky Izoelektrická fokusace. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá hlavní zóna polohou hlavní zóně na elektroforeogramu porovnávacího roztoku. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (c) je pouze jedna hlavní zóna.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné bílkoviny, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Provede se peptidové mapování.

Zkoušený roztok. Připraví se roztok zkoušené látky v *tlumivém roztoku trisacetatovém o pH 8,5* tak, aby obsahoval 2,0 mg somatropinu v mililitru. Asi 1,0 ml takto připraveného roztoku se přenese do zkumavky z vhodného materiálu, např. polypropylenu. Připraví se čerstvý roztok *trypsinu pro peptidové mapování R* (1 g/l) ve vhodném *tlumivém octanovém roztoku o pH asi 5,0* a 30 µl se přidá k roztoku zkoušené látky. Zkumavka se uzavře a vloží se na 4 h do vodní lázně 37 °C teplé. Potom se zkumavka vyjme z vodní lázně a ihned se probíhající reakce přeruší přidáním 200 µl *kyseliny octové ledové R.*

Porovnávací roztok. Současně se za stejných podmínek připraví porovnávací roztok s tím rozdílem, že zkoušená látka je nahrazena *somatropinem CRL.*

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí mobilní fáze A a mobilní fáze B, které se připraví následujícím způsobem: 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* se zředí *vodou R* na 1000 ml (mobilní fáze A). Ke 100 ml *vody R* se přidá 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* a zředí se *acetonitrilem R* na 1000 ml (mobilní fáze B). Průtoková rychlost je 1 ml/min. Použije se následující gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)
0	100	0
20	80	20
40	75	25
65	50	50

- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Kolona se nejméně 15 min ustaluje mobilní fází A. Potom se kolona promývá za použití výše uvedeného gradientu a pokračuje se s promýváním po dobu 5 min s průběžně se zvyšující koncentrací mobilní fáze B až na 80 % v průběhu tohoto času. Potom se kolona opět ustaluje mobilní fází A po dobu 15 min. Nastříkne se odděleně po 100 µl každého roztoku. Na konci gradientové eluce a před dalším nástřikem se zvýší koncentrace mobilní fáze B na 80 % v průběhu 5 min a poté se kolona 15 min ustaluje mobilní fází A.

Chromatogram zkoušeného roztoku odpovídá chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogramy jednotlivých roztoků kvalitativně odpovídají porovnávacímu chromatogramu dodávanému se *somatropinem CRL.*

D. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). Připraví se roztok v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.

Zkoušený roztok (b). 100 µl zkoušeného roztoku (a) se zředí *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,5 (1)* na 2,0 ml.

Porovnávací roztok (a). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.

Porovnávací roztok (b). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu. K takto připravenému roztoku se přidá čerstvě připravený koncentrovaný roztok *peroxidu vodíku R* tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,01 % (*V/V*), a nechá se 5 h stát při 4 °C. Potom se na mililitr roztoku přidá 4,5 mg *L-methioninu R*.

Roztoky se uchovávají při teplotě 2 °C až 8 °C a použijí se do 24 h. Pokud se používá automatický dávkovač, je nutno jej udržovat při 2 °C až 8 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem butylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *propanolu R* a *tlumivého roztoku trometamolového o pH 7,5 (1)* (29 + 71), s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Teplota kolony se udržuje při 45 °C.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a). Je-li třeba, upraví se koncentrace propanolu v mobilní fázi tak, aby retenční čas hlavního píku byl (33 ± 3) min. Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b). Určí se píky pomocí porovnávacího chromatogramu dodávaného se *somatropinem CRL*. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi somatropinem a jeho oxidačním produktem je nejméně 1,0.

Nastříkne se po 20 µl každého roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu nejméně 50 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (5,0 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (10,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědel.

Dimer a příbuzné látky s vyšší molekulovou hmotností. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*), jak je popsána ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (a). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku na získaném chromatogramu dosahovala 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače. Rozlišení dané poměrem výšky minima mezi píky monomeru a dimeru k výšce píku dimeru je menší než 0,6 (retenční časy vztažené k monomeru jsou přibližně 0,94 pro dimer a 0,87 pro polymery). Několikrát se nastříkne porovnávací roztok (a) (nejméně třikrát); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku je menší než 2,5 %.

Nastříkne se po 50 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků s retenčním časem menším, než je retenční čas

hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (4,0 %).

Izoelektrická fokusace. Provede se izoelektrická fokusace.

Zkoušený roztok (a). Připraví se roztok zkoušené látky v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.
Zkoušený roztok (b). 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) na 2,0 ml.
Zkoušený roztok (c). Smíchá se 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) a 0,1 ml porovnávacího roztoku.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok *somatropinu CRL* ve *vodě R* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.
Roztok pro kalibraci izoelektrického bodu o rozmezí pH 2,5 až 6,5. Připraví se a použije podle návodu výrobce.

Se zařízením se pracuje podle návodu výrobce. Izoelektrická fokusace se provádí na hotových deskách s vrstvou gelu o rozměrech 245 mm x 110 mm x 1 mm a pH v rozmezí 4,0 až 6,5. Na vrstvu gelu se nanese odděleně po 15 µl každého roztoku. Jako anodický roztok se použije roztok *kyseliny glutamové R* (147,1 g/l) v roztoku *kyseliny fosforečné R* (50 g H_3PO_4/l) a jako katodický roztok se použije roztok *ß-alaninu R* (89,1 g/l). Pracovní podmínky se nastaví na 2000 V a 25 mA. Nechá se proběhnout fokusace při konstantním napětí po dobu 2,5 h. Vrstva gelu se ponoří na 30 min do roztoku obsahujícího *kyselinu trichloroctovou R* (115 g/l) a *kyselinu sulfosalicylovou R* (34,5 g/l) a potom na 5 min do směsi objemových dílů *kyseliny octové R*, *ethanolu R* a deionizované *vody R* (8 + 25 + 67) (odbarvovací roztok). Vrstva gelu se vybarvuje ponořením na 10 min do roztoku *modře brilantní R* (1,15 g/l) v odbarvovacím roztoku zahřátého na 60 °C a potom se ponoří do odbarvovacího roztoku do odstranění nadbytku barviva. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozdělení zón roztoku pro kalibraci izoelektrického bodu odpovídá požadavkům výrobce. Na elektroforeogramu porovnávacího roztoku je viditelná hlavní zóna s izoelektrickým bodem okolo 5 a kyselejší menší zóna okolo 4,8. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) žádná zóna, kromě hlavní zóny, nepřevyšuje svou intenzitou hlavní zónu na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (b) (5,0 %).

Voda. Nejvýše 10,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu. *Použijí se suché skleněné pomůcky, jež mohou být s vrstvou silikonu.*

Roztok vnitřního standardu. 15 µl *methanolu bezvodého R* se zředí *2-propanolem R1* na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 mg se suspenduje v 0,1 ml *2-propanolu R1*, 30 min se třepe a potom se odstředí; použije se čirý odstředěný roztok.
Zkoušený roztok (b). 1,0 mg se suspenduje v 0,1 ml roztoku vnitřního standardu, 30 min se třepe a potom se odstředí; použije se čirý odstředěný roztok.
Porovnávací roztok. 10 µl *vody R* se přidá k 50 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (180 µm až 250 µm).
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- tepelněvodivostního detektoru.

Teplota kolony se udržuje při 120 °C a teplota detektoru při 150 °C.

Nastříkne se zvolený objem všech roztoků. Vypočítá se obsah vody za předpokladu, že hustota vody (*2.2.5*) je při 20 °C 0,997 g/ml, a bere se v úvahu množství vody detegovatelné v roztoku vnitřního standardu.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanoví se vylučovací chromatografií (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. Připraví se roztok zkoušené látky v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 1,0 mg somatropinu.
Porovnávací roztok (a). 200 µl zkoušeného roztoku se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 1,0 mg somatropinu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 9,4 mm naplněné *silikagelem hydrofilním pro chromatografii R* jakosti vhodné pro dělení globulárních bílkovin v rozmezí molekulové hmotnosti 5000 až 60 000,
- mobilní fáze, kterou je zfiltrovaný a odplyněný roztok *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l), s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (b). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku dosahovala nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Několikrát se nastříkne porovnávací roztok (b) (nejméně třikrát); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku je nejvýše 2,5 %. Nastřikuje se střídavě po 50 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b).

Obsah somatropinu se vypočítá z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) a deklarovaného obsahu látky $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ v *somatropinu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Sorbitani lauras

Sorbitanlaurat

Synonymum. Sorbitanum lauricum

CAS 1338-39-2

Je to směs získaná obvykle částečnou esterifikací kyseliny laurové se sorbitolem a jeho mono- a dianhydridy.

Vlastnosti

Hnědavě žlutá viskózní kapalina. Je prakticky nerozpustný, ale dispergovatelný ve vodě, mísitelný s lihem 96%, těžce rozpustný v bavlníkovém oleji.

Relativní hustota je asi 0,98.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit na asi 80 °C, přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a vaří se asi 10 min pod zpětným chladičem do zrušení emulze. Mastné kyseliny se oddělí na povrchu jako olejová vrstva. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a mastné kyseliny se opatrným třepáním extrahují s 50 ml *etheru petrolejového R1*. Horní vrstva se vysuší pomocí 1 g *síranu sodného bezvodého R,* zfiltruje se a zahřívá se na vodní lázni do vymizení pachu rozpouštědel. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 260 až 280; stanoví se s 0,30 g.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 7,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 330 až 358 (Metoda A).

Číslo jodové *(2.5.4)*. Nejvýše 10.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 158 až 170; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,5 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Sorbitani oleas

Sorbitanoleat

Synonymum. Sorbitanum oleicum

CAS 1338-43-8

Je to směs získaná obvykle částečnou esterifikací kyseliny olejové se sorbitolem a jeho mono- a dianhydridy.

Vlastnosti

Hnědavě žlutá viskózní kapalina. Je prakticky nerozpustný, ale dispergovatelný ve vodě, dobře rozpustný v mastných olejích za vzniku zakalených roztoků, těžce rozpustný v etheru, mísitelný s lihem 96%.

Relativní hustota je asi 0,99.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit na asi 80 °C, přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a vaří se asi 10 min pod zpětným chladičem do zrušení emulze. Mastné kyseliny se oddělí na povrchu jako olejová vrstva. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a mastné kyseliny se opatrným třepáním extrahují s 50 ml *etheru petrolejového R1*. Horní vrstva se vysuší pomocí 1 g *síranu sodného bezvodého R,* zfiltruje se a zahřívá se na vodní lázni do vymizení pachu rozpouštědel. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 190 až 210; stanoví se s 0,30 g.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 8,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 190 až 210 (Metoda A); stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Číslo jodové *(2.5.4)*. 62 až 76.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 10,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 149 až 160; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,5 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Sorbitani palmitas

Sorbitanpalmitat

Synonymum. Sorbitanum palmiticum

CAS 26266-57-9

Je to směs získaná obvykle částečnou esterifikací kyseliny palmitové se sorbitolem a jeho mono- a dianhydridy.

Vlastnosti

Nažloutlý nebo žlutý prášek, voskové vločky nebo tvrdá hmota. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v mastných olejích, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání (*2.2.15*). 44 °C až 51 °C. Roztavená zkoušená látka se vpraví do skleněné kapiláry a ponechá se 24 h při teplotě pod 10 °C.

B. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit na asi 80 °C, přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a vaří se asi 10 min pod zpětným chladičem do zrušení emulze. Mastné kyseliny se oddělí na povrchu jako olejová vrstva. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a mastné kyseliny se opatrným třepáním extrahují s 50 ml *etheru petrolejového R1*. Horní vrstva se vysuší pomocí 1 g *síranu sodného bezvodého R,* zfiltruje se a zahřívá se na vodní lázni do vymizení pachu rozpouštědel. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 210 až 230; stanoví se s 0,30 g.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 8,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 270 až 305 (Metoda A).

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 140 až 155; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,5 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Sorbitani stearas

Sorbitanstearat

Synonymum. Sorbitanum stearicum

CAS 1338-41-6

Je to směs získaná obvykle částečnou esterifikací kyseliny stearové se sorbitolem a jeho mono- a dianhydridy.

Vlastnosti

Světle žlutá voskovitá hmota. Je prakticky nerozpustný, ale dispergovatelný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Teplota tání (*2.2.15*). 50 °C až 55 °C. Roztavená zkoušená látka se vpraví do skleněné kapiláry a ponechá se 24 h při teplotě pod 10 °C.

B. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit na asi 80 °C, přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a vaří se asi 10 min pod zpětným chladičem do zrušení emulze. Mastné kyseliny se oddělí na povrchu jako olejová vrstva. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a mastné kyseliny se opatrným třepáním extrahují s 50 ml *etheru petrolejového R1*. Horní vrstva se vysuší pomocí 1 g *síranu sodného bezvodého R,* zfiltruje se a zahřívá se na vodní lázni do vymizení pachu rozpouštědel. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 200 až 215; stanoví se s 0,30 g.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 10,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 235 až 260 (Metoda A).

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 5,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 147 až 157; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,5 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Sorbitani trioleas

Sorbitantrioleat

CAS 26658-19-5

Je to směs získaná obvykle částečnou esterifikací kyseliny olejové se sorbitolem a jeho monoanhydridem.

Vlastnosti

Světle žlutá, slabě nažloutlá nebo hnědá pevná hmota, která při asi 25 °C přechází na hnědavě žlutou viskózní olejovitou kapalinu. Je prakticky nerozpustný, ale dispergovatelný ve vodě, snadno rospustný v etheru, dobře rozpustný v mastných olejích, těžce rozpustný v lihu 96%.

Relativní hustota je asi 0,98.

Zkoušky totožnosti

A. Zkouška Číslo hydroxylové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Zkouška Číslo jodové, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Ke 4 g se přidá 40 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (50 g/l) a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit na asi 80 °C, přidá se 20 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a vaří se asi 10 min pod zpětným chladičem do zrušení emulze. Mastné kyseliny se oddělí na povrchu jako olejová vrstva. Po ochlazení se směs převede do dělicí nálevky a mastné kyseliny se opatrným třepáním extrahují s 50 ml *etheru petrolejového R1*. Horní vrstva se vysuší pomocí 1 g *síranu sodného bezvodého R,* zfiltruje se a zahřívá se na vodní lázni do vymizení pachu rozpouštědel. Číslo kyselosti (*2.5.1*) zbytku je 190 až 210; stanoví se s 0,30 g.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 16,0; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*). 55 až 75 (Metoda A).

Číslo jodové *(2.5.4)*. 76 až 90.

Číslo peroxidové *(2.5.5)*. Nejvýše 10,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 170 až 190; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

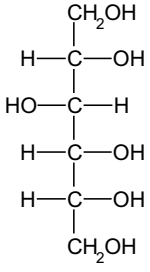
Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 0,5 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Sorbitolum

Sorbitol



$C_6H_{14}O_6$ M_r 182,17 CAS 50-70-4

Je to D-glucitol. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_6H_{14}O_6$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se zahřívá s 0,5 ml *pyridinu R* a 5 ml *acetanhydridu R* do rozpuštění. Po 10 min se směs vlije do 25 ml *vody R* a nechá se stát 2 h v ledové vodě. Sraženina rekrystalizovaná z malého množství *lihu 96% R* a vysušená ve vakuu taje (*2.2.14*) při asi 100 °C.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *sorbitolu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (10 + 20 + 70) po dráze 17 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *kyselinou 4-aminobenzoovou RS*. Potom se vrstva suší v proudu studeného vzduchu do vymizení pachu acetonu, 15 min se zahřívá při 100 °C a po ochlazení se postříká roztokem *jodistanu sodného R* (2 g/l). Vrstva se znovu suší v proudu studeného vzduchu a 15 min se zahřívá při 100 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. Ke 3 ml čerstvě připraveného roztoku *pyrokatecholu R* (100 g/l) se za chlazení v ledové vodě přidá 6 ml *kyseliny sírové R*. Ke 3 ml ochlazené směsi se přidá 0,3 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, a asi 30 s se opatrně zahřívá nad plamenem; vzniká růžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a zředí se stejným rozpouštědlem na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.* K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS.* Po přidání nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na růžové. K dalším 10 ml roztoku se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS.* Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7).* +4,0° až +7,0°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený takto: 5,00 g zkoušené látky a 6,4 g *tetraboritanu sodného R* se rozpustí ve 40 ml *vody R,* nechá se stát 1 h za občasného promíchání a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. Je-li třeba, zfiltruje se.

Redukující cukry. 5,0 g se rozpustí mírným zahřátím ve 3 ml *vody R*, ochladí se a přidá se 20 ml *citronanu měďnatého RS* a několik skleněných kuliček. Směs se během 4 min uvede do varu a vaří se 3 min. Rychle se ochladí a přidá se 100 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 2,4% *(V/V)* a 20,0 ml *jodu 0,025 mol/l VS.* Za stálého protřepávání se přidá 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (6 + 94). Po rozpuštění sraženiny se nadbytek jodu titruje *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátor. Při titraci se spotřebuje nejméně 12,8 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS.*

Chloridy *(2.4.4).* 10 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13).* 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Olovo *(2.4.10).* Vyhovuje limitní zkoušce Olovo v cukrech (0,5 μg/g).

Nikl *(2.4.15).* Vyhovuje limitní zkoušce Nikl v polyolech (1 μg/g).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* Nejvýše 1,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14).* Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li:
- nejvýše 4 m.j. endotoxinu v gramu pro parenterální přípravky obsahující méně než 100 g/l sorbitolu,
- nejvýše 2,5 m.j. endotoxinu v gramu pro parenterální přípravky obsahující 100 g/l nebo více sorbitolu.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 20,0 ml roztoku *jodistanu sodného R (*21,4 g/l) a 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se na vodní lázni přesně 15 min. Po ochlazení se přidají 3 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a za okamžik 25,0 ml *arsenitanu sodného 0,1 mol/l VS.* Po promíchání se přidá 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l) a nechá se 15 min stát. Titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do prvního žlutého zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 1,822 mg $C_6H_{14}O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné, nejvyšší koncentrace bakteriálních endotoxinů.

Sorbitolum 70% cristallisabile

Sorbitol 70% krystalizující

Je to vodný roztok obsahující 68,0 % až 72,0 % hexitolů, vyjádřeno jako D-glucitol.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá sirupovitá tekutina. Je mísitelný s vodou, s glycerolem 85% a s propylenglykolem, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. K 7,0 g se přidá 40 ml *vody R* a 6,4 g *tetraboritanu sodného R*, za občasného protřepání se nechá 1 h stát a potom se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Je-li třeba, zfiltruje se; úhel otočení (*2.2.7*) je 0° až +1,5°.

B. 1 g se usuší ve vakuu při 80 °C. 0,5 g zbytku se zahřívá s 0,5 ml *pyridinu R* a 5 ml *acetanhydridu R* do rozpuštění. Po 10 min se směs vlije do 25 ml *vody R* a nechá se stát 2 h v ledové vodě. Sraženina rekrystalizovaná z malého množství *lihu 96% R* a vysušená ve vakuu taje (*2.2.14*) při asi 100 °C.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 70 mg se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *sorbitolu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (10 + 20 + 70) po dráze 17 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *kyselinou 4-aminobenzoovou RS*. Potom se vrstva suší v proudu studeného vzduchu do vymizení pachu acetonu, 15 min se zahřívá při 100 °C a po ochlazení se postříká roztokem *jodistanu sodného R* (2 g/l). Vrstva se znovu suší v proudu studeného vzduchu a 15 min se zahřívá při 100 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Ke 3 ml čerstvě připraveného roztoku *pyrokatecholu R* (100 g/l) se za chlazení v ledové vodě přidá 6 ml *kyseliny sírové R*. Ke 3 ml ochlazené směsi se přidá 0,3 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, a asi 30 s se opatrně zahřívá nad plamenem; vzniká růžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 7,0 g se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS*. Po přidání nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na růžové. K dalším 10 ml roztoku se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Index lomu (*2.2.6*). 1,457 až 1,462.

Relativní hustota (*2.2.5*). Nejméně 1,290.

Redukující cukry. K 5,0 g se přidají 3 ml *vody R*, 20 ml *citronanu měďnatého RS* a několik skleněných kuliček. Směs se během 4 min uvede do varu a vaří se 3 min. Rychle se ochladí a přidá se 100 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 2,4% *(V/V)* a 20,0 ml *jodu 0,025 mol/l VS*. Za stálého protřepávání se přidá 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (6 + 94). Po rozpuštění sraženiny se nadbytek jodu titruje *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátor. Při titraci se spotřebuje nejméně 12,8 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,5 g se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Olovo *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce Olovo v cukrech (0,5 μg/g).

Nikl *(2.4.15)*. Vyhovuje limitní zkoušce Nikl v polyolech (1 μg/g).

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,600 g se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 20,0 ml roztoku *jodistanu sodného R (*21,4 g/l) a 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se na vodní lázni přesně 15 min. Po ochlazení se přidají 3 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a za okamžik 25,0 ml *arsenitanu sodného 0,1 mol/l VS*. Po promíchání se přidá 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l) a nechá se 15 min stát. Titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do prvního žlutého zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 1,822 mg $C_6H_{14}O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Sorbitolum 70% non cristallisabile

Sorbitol 70% nekrystalizující

Je to vodný roztok hydrogenovaného a částečně hydrolyzovaného škrobu. Obsahuje 68,0 % až 72,0 % sušiny a nejméně 62,0 % polyolů, vyjádřeno jako D-glucitol.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá sirupovitá tekutina. Je mísitelný s vodou, s glycerolem 85% a s propylenglykolem.

Zkoušky totožnosti

A. K 7,0 g se přidá 40 ml *vody R* a 6,4 g *tetraboritanu sodného R*, za občasného protřepání se nechá 1 h stát a potom se zředí *vodou R* na 50,0 ml. Je-li třeba, zfiltruje se; úhel otočení (*2.2.7*) je +1,5° až +3,5°.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 70 mg se zředí *vodou R* na 20 ml.

Porovnávací roztok. 50 mg *sorbitolu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *ethylacetatu R* a *1-propanolu R* (10 + 20 + 70) po dráze 17 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *kyselinou 4-aminobenzoovou RS*. Potom se vrstva suší v proudu studeného vzduchu do vymizení pachu acetonu, 15 min se zahřívá při 100 °C a po ochlazení se postříká roztokem *jodistanu sodného R* (2 g/l). Vrstva se znovu suší v proudu studeného vzduchu a 15 min se zahřívá při 100 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku. K dalším skvrnám se nepřihlíží.

C. Ke 3 ml čerstvě připraveného roztoku *pyrokatecholu R* (100 g/l) se za chlazení v ledové vodě přidá 6 ml *kyseliny sírové R*. Ke 3 ml ochlazené směsi se přidá 0,3 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, a asi 30 s se opatrně zahřívá nad plamenem; vzniká růžové zbarvení, které přechází v intenzivní hnědočervené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 7,0 g se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS*. Po přidání nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* se zbarvení indikátoru změní na růžové. K dalším 10 ml roztoku se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na červené se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Index lomu (*2.2.6*). 1,455 až 1,465.

Relativní hustota (*2.2.5*). Nejméně 1,290.

Redukující cukry. K 5,0 g se přidají 3 ml *vody R*, 20 ml *citronanu měďnatého RS* a několik skleněných kuliček. Směs se během 4 min uvede do varu a vaří se 3 min. Rychle se ochladí a přidá se 100 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 2,4% *(V/V)* a 20,0 ml *jodu 0,025 mol/l VS*. Za stálého protřepávání se přidá 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (6 + 94). Po rozpuštění sraženiny se nadbytek jodu titruje *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátor. Při titraci se spotřebuje nejméně 12,8 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS*.

Redukující cukry po hydrolýze. K 6,0 g se přidá 35 ml *vody R*, 40 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a několik skleněných kuliček. Vaří se 4 h pod zpětným chladičem. Pak se ochladí a zneutralizuje se *hydroxidem sodným zředěným RS* na modř bromthymolovou. Ochladí se a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. K 3,0 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *vody R*, 20 ml *citronanu*

měďnatého RS a několik skleněných kuliček. Směs se během 4 min uvede do varu a vaří se 3 min. Rychle se ochladí a přidá se 100 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 2,4% *(V/V)* a 20,0 ml *jodu 0,025 mol/l VS*. Za stálého protřepávání se přidá 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (6 + 94). Po rozpuštění sraženiny se nadbytek jodu titruje *thiosíranem sodným 0,05 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* přidaného před koncem titrace jako indikátor. Při titraci se spotřebuje 8,0 ml až 14,8 ml *thiosíranu sodného 0,05 mol/l VS*.

Chloridy *(2.4.4)*. 7,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1,5 g se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 μg/g).

Olovo *(2.4.10)*. Vyhovuje limitní zkoušce Olovo v cukrech (0,5 μg/g).

Nikl *(2.4.15)*. Vyhovuje limitní zkoušce Nikl v polyolech (1 μg/g).

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Sušina. 1,000 g se usuší ve vakuu při 80 °C (*2.2.32*) a zbytek se zváží.

Polyoly. 0,600 g se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 20,0 ml roztoku *jodistanu sodného R (*21,4 g/l) a 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zahřívá se na vodní lázni přesně 15 min. Po ochlazení se přidají 3 g *hydrogenuhličitanu sodného R* a za okamžik 25,0 ml *arsenitanu sodného 0,1 mol/l VS.* Po promíchání se přidá 5 ml roztoku *jodidu draselného R* (200 g/l) a nechá se 15 min stát. Titruje se *jodem 0,05 mol/l VS* do prvního žlutého zbarvení. Současně se provede slepá zkouška.

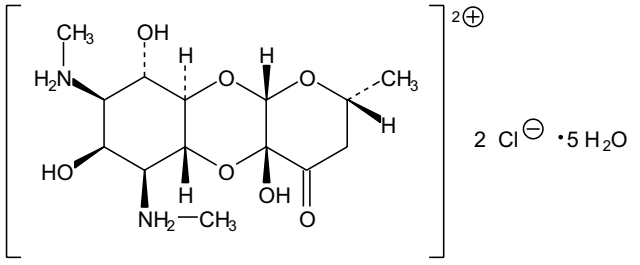
1 ml *jodu 0,05 mol/l VS* odpovídá 1,822 mg $C_6H_{14}O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Spectinomycini hydrochloridum

Spektinomyciniumchlorid



$C_{14}H_{26}Cl_2N_2O_7 \cdot 5H_2O$ M_r 495,35 CAS 22189-35-8

M_r bezvodého 405,27

Je to pentahydrát (2*R*,4a*R*,5a*R*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*,9a*R*,10a*S*)-6,8-(perhydro-4a,7,9-trihydroxy-2-methyl--4-oxo-pyrano[2,3-*b*][1,4]benzodioxinyl)-bis(methylamoniumchloridu).Je to antibiotikum produkované kmenem mikroorganismu *Streptomyces spectabilis* nebo získané jinými způsoby. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 95 % až 100,5 % sloučeniny $C_{14}H_{26}Cl_2N_2O_7$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý slabě hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *spektinomyciniumchloridu CRL.*

B. 1,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. 2,0 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20,0 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH *(2.2.3).* 3,8 až 5,6; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7).* +15° až +21°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok S do 20 min od přípravy.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 2,0 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R, pyridinu R, vody R* a *1-propanolu R* (5 + 5 + 40 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (50 g/l) a nechá se stát 2 min až 3 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12).* 16,0 % až 20,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14).* Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,09 m.j. endotoxinu v miligramu. Připraví se roztoky za použití roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* 4,2 g/l .

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *fenazonu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,150 g *fenazonu R* se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 100 ml.

Zkoušené roztoky a porovnávací roztok se 1 h nechají stát a pak se ihned provede zkouška.

Zkoušený roztok (a). K 60,0 mg v odměrné baňce se přidá 10 ml *dimethylformamidu R* a 2,0 ml *hexamethyldisilazanu R.* Třepe se do rozpuštění a pak se zředí *dimethylformamidem R* na 20,0 ml.

Zkoušený roztok (b). K 60,0 mg v odměrné baňce se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a 2,0 ml *hexamethyldisilazanu R.* Třepe se do rozpuštění a pak se zředí *dimethylformamidem R* na 20,0 ml.

Porovnávací roztok. K 60,0 mg *spektinomyciniumchloridu CRL* v odměrné baňce se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a 2,0 ml *hexamethyldisilazanu R.* Třepe se do rozpuštění a pak se zředí *dimethylformamidem R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (125 μm až 150 μm), impregnovanou 3 % směsi *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 45 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- elektronického integrátoru.

Teplota kolony se udržuje na 200 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru mezi 200 °C a 230 °C. Nastříknou se zvolené objemy zkoušených roztoků. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) je rozlišení mezi hlavním píkem a píkem vnitřního standardu nejméně 8,0. Nastříkne se střídavě zkoušený roztok (b) a porovnávací roztok.

Vypočte se obsah spektinomycinu v procentech.

Uchovávání

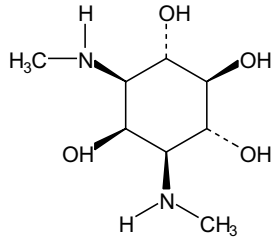
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě nepřevyšující 30 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

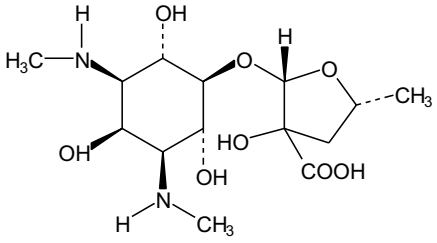
Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

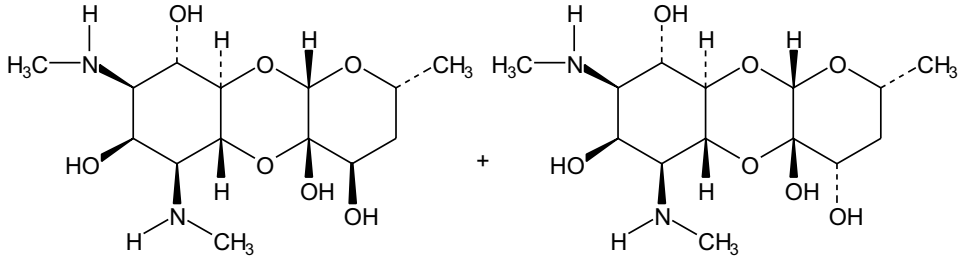
Nečistoty



A. aktinamin,

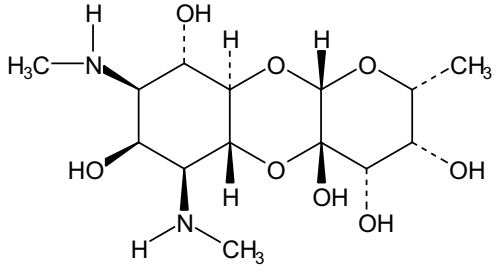


B. kyselina aktinospektinoová,



(4R) (4S)

C. dihydrospektinomyciny,

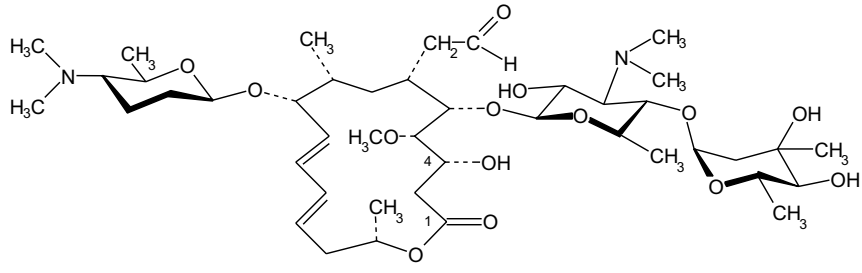


(3S, 4S)

D. dihydroxyspektinomycin.

† Spiramycinum

Spiramycin



$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$ M_r 843,06 CAS 8025-81-8

Je to makrolidové antibiotikum produkované určitými kmeny *Streptomyces ambofaciens* nebo získané jiným způsobem. Hlavní složkou je (4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*,10*R*,16*R*)-(11*E*,13*E*)-6-[(0-2,6-dideoxy--3-C-methyl-α-L-*ribo*-hexopyranosyl)-(1→4)-(3,6-dideoxy-3-dimethylamino-ß-D-glukopyranosyl)-oxy]-7-formylmethyl-4-hydroxy-5-methoxy-9,16-dimethyl-10-[(2,3,4,6-tetradeoxy-4-dimethylamino--D-*erythro*-hexopyranosyl)oxy]oxacyklohexadeka-11,13-dien-2-on. Účinnost je nejméně 3900 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý slabě hygroskopický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v methanolu, mírně rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 220 nm až 350 nm *(2.2.25)*. Roztok vykazuje absorpční maximum při 232 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 340.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Jestliže na chromatogramu zkoušeného roztoku je jedna nebo dvě další skvrny s hodnotami R_F slabě vyššími, než má hlavní skvrna, mají tyto skvrny podobnou polohu a zbarvení jako vedlejší skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a liší se od skvrn na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

C. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a přidá se 25 ml *vody R*. pH se upraví *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na hodnotu 8 a zředí se *vodou R* na 50 ml. K 5 ml tohoto roztoku se přidají 2 ml směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (1 + 2); vzniká hnědé zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 8,5 až 10,5; měří se následující roztok: 0,5 g se rozpustí v 5 ml *methanolu R* a zředí se *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 100 ml.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -80° až -85°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g v *kyselině octové zředěné R* 10% *(V/V)* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 40 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 40 mg *spiramycinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 2 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (e). 40 mg *erythromycinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *2-propanolu R*, roztoku *octanu amonného R* (150 g/l), jehož pH bylo předem upraveno na hodnotu 9,6 *hydroxidem sodným koncentrovaným RS*, a *ethylacetatu R* (4 + 8 + 9) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS1* a 5 min se zahřívá při 110 °C. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou dvě skvrny s poněkud vyšší hodnotou R_F, než má hlavní skvrna: skvrna bližší hlavní skvrně odpovídá monoesteru kyseliny octové a vzdálenější skvrna odpovídá monoesteru kyseliny propionové. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna odpovídající monoesteru kyseliny octové intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5,0 %); žádná skvrna odpovídající monoesteru kyseliny propionové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (10,0 %); žádná skvrna kromě hlavní skvrny a skvrn odpovídajících monoesterům kyseliny octové a propionové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (2,0 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 3,5 %; 0,500 g se 6 h suší nad *oxidem fosforečným R* při 80 °C a při tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení účinnosti

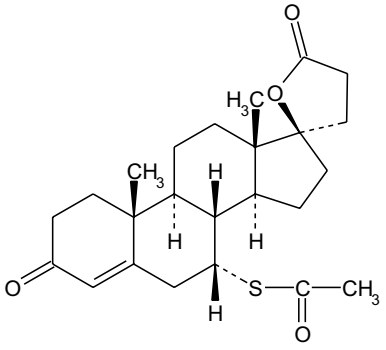
Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik *(2.7.2)*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

† Spironolactonum

Spironolakton



$C_{24}H_{32}O_4S$ M_r 416,57 CAS 52-01-7

Je to 7α-acetylthio-3-oxo-17α-pregn-4-en-21,17-karbolakton. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{24}H_{32}O_4S$.

Vlastnosti

Bílý až nažloutle bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *spironolaktonu CRL*. Měří se roztoky látek (50 g/l) v *chloroformu R.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R*

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 20 mg *spironolaktonu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *cyklohexanu R* a *ethylacetatu R* (1 + 24 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K asi 10 mg se přidají 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* 50% (*V/V*) a protřepe se; vznikne oranžové zbarvení s intenzivní žlutavě zelenou fluorescencí. Roztok se mírně zahřeje; barva se změní na tmavě červenou a vyvíjí se sirovodík, který barví *papír s octanem olovnatým R* do černa. Přidá se 10 ml *vody R;* vznikne zelenožlutý roztok, který opalizuje nebo se sráží.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -33° až -37°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v *chloroformu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29*).

Zkoušený roztok. 62,5 mg se rozpustí v 2,5 ml *tetrahydrofuranu R* a zředí se mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 25,0 mg *kanrenonu CRL* se rozpustí v 1,0 ml *tetrahydrofuranu R* a zředí se mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml zkoušeného roztoku se smíchá s 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 0,50 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,15 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R, tetrahydrofuranu R* a *vody R* (8 + 18 + 74), s průtokovou rychlostí 1,8 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru s proměnlivou vlnovou délkou pracujícího při 254 nm a 283 nm.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a), 20 µl porovnávacího roztoku (d) a 20 µl porovnávacího roztoku (e) a zaznamenají se chromatogramy při nastavení detektoru na 254 nm po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času spironolaktonu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě píku spironolaktonu a kanrenonu, není větší než plocha píku spironolaktonu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). K píkům s plochou menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) se nepřihlíží.

Pak se nastříkne 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (c) a zaznamenají se chromatogramy při nastavení detektoru na 283 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího kanrenonu větší než plocha píku kanrenonu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %). Vypočítá se obsah kanrenonu v procentech ze záznamů při 283 nm a obsah ostatních příbuzných látek v procentech ze záznamů při 254 nm. Uvedená procenta se sečtou; součet není větší než 1,0 %.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dva oddělené píky odpovídající kanceronu a spironolaktonu s rozlišením nejméně 1,4 a jestliže hlavní pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) má poměr signálu k šumu nejméně 6.

Volné merkaptosloučeniny. 2,0 g se protřepávají 1 min s 20 ml *vody R* a směs se zfiltruje. K 10,0 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *jodu 0,01 mol/l VS* a 0,1 ml *škrobu RS* a promíchá se; vzniká modré zbarvení.

Chrom. K 0,20 g v platinovém kelímku se přidá 1 g *uhličitanu draselného R* a 0,3 g *dusičnanu draselného R*. Jemně se zahřívá do roztavení a pak se spaluje při teplotě 600 °C až 650 °C až do odstranění uhlíku. Po ochlazení se zbytek, je-li třeba mírným zahřátím, úplně rozpustí v 10 ml *vody R*, zfiltruje se a zředí se *vodou R* na 20 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 0,5 g *močoviny R* a roztok *kyseliny sírové R* 14% (*V/V*) až do kyselé reakce. Jakmile přestane unikání bublinek, přidá se navíc 1 ml stejného roztoku kyseliny sírové, zředí se *vodou R* na 20,0 ml a přidá se 0,5 ml *difenylkarbazidu RS*. Tento roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok

připravený za použití 1,0 ml roztoku *kyseliny sírové R* 14% (*V/V*), 0,50 ml čerstvě připraveného roztoku *dichromanu draselného R* (28,3 mg/l), s následujícím naředěním *vodou R* na 20,0 ml a s přidáním 0,5 ml *difenylkarbazidu RS* (50 μg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se 3 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v maximu při 238 nm.

Vypočte se obsah $C_{24}H_{32}O_4S$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 470.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Stramonii folium

Durmanový list

Synonymum. Folium stramonii

Je to usušený list nebo usušený list spolu s kvetoucími a někdy i plodonosnými vrcholky druhu *Datura stramonium* L. a jeho odrůd. Obsahuje nejméně 0,25 % alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$; M_r 289,4), vztaženo na drogu vysušenou při 100 °C až 105 °C. Alkaloidy tvoří zejména hyoscyamin provázený menším množstvím hyoscinu (skopolaminu).

Vlastnosti

Droga má nepříjemný pach.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Listy tmavě hnědozelené až tmavě šedozelené, sušením často svraskalé, dohromady shloučené, tenké a křehké, vejčité nebo trojhranně vejčité, hluboce vykrajované, s protáhlou koncovou špičkou, na bázi často nesouměrné. Mladé listy na žilnatině chlupaté, starší listy téměř lysé. Stonky zelené nebo nachově zelené, tenké, ohnuté a zkroucené, podélně svraštělé, často příčně rýhované, dichasiálně větvené, v paždí s jedním květem nebo nezralým plodem. Květy s krátkou stopkou mají srostloplátečný kalich s pěti ušty a nálevkovitou hnědobílou nebo nafialovělou korunou. Plod je tobolka, zpravidla pokrytá četnými krátkými, vzpřímenými ostny, semena jsou hnědá až černá s jemně jamkovitým osemením.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky čepele listu s buňkami se stěnami slabě vlnitě zprohýbanými a s hladkou kutikulou; anizocytické a anomo-

cytické průduchy (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu; krycí chlupy kuželovité, jednořadé, tříbuněčné až pětibuněčné, s bradavčitými stěnami. Žláznaté chlupy krátké, paličkovité, s dvoubuněčnou až sedmibuněčnou hlavičkou. Dorziventrální mezofyl s jednou řadou palisádových buněk, houbový parenchym s drúzami šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. V práškované droze mohou být patrná vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; kulovitá pylová zrna zpravidla 60 μm až 80 μm v průměru, se třemi klíčními póry a téměř hladkou exinou. Úlomky koruny s papilózní pokožkou; úlomky semene obsahující žlutohnědé zprohýbané sklereidy osemení; občas krystaly a písek šťavelanu vápenatého.

C. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografie, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů.

D. 1 g práškované drogy (180) se protřepává 2 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Opatrně se protřepává s 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R* tak, aby se netvořila emulze. Vrchní vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*. Zfiltruje se a ether se odpaří na porcelánové misce. Přidá se 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného* (30 g/l) v *lihu 96% R;* vznikne tmavě fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (180) se protřepává 15 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*. Roztok se zfiltruje a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do konečného objemu 25 ml filtrátu. Přidá se 1 ml *amoniaku 26% R* a pak se protřepává dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené etherové výtřepky se vysuší *síranem sodným bezvodým R*. Zfiltruje se a filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

Porovnávací roztok. 50 mg *hyoscyaminiumsulfatu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolaminiumbromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. 3,8 ml roztoku hyoscyaminiumsulfatu a 4,2 ml roztoku skopolaminiumbromidu se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl a 20 μl obou roztoků; vzdálenost mezi jednotlivými pruhy je 1 cm. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká asi 10 ml *jodobismutitanu draselného RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrny další slabě zbarvené skvrny; při nanášce 20 μl ve střední části chromatogramu, při nanášce 10 μl v blízkosti startu. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná. Pozoruje se po 15 min. Skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin), další skvrny již nejsou patrné.

Cizí příměsi (*2.8.2*) Nejvýše 3 % stonků o průměru větším než 5 mm.

Celkový popel (*2.4.16*) Nejvýše 20,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*) Nejvýše 4,0 %.

Stanovení obsahu

Asi 50 g drogy se upráškuje na předepsaný stupeň (180). Práškovaná droga se použije ke zkouškám Ztráta sušením a Stanovení obsahu.

a) Ztráta sušením (*2.2.32*). 2,000 g práškované drogy (180) se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

b) 10,00 g práškované drogy (180) se navlhčí směsí složenou z 5 ml *amoniaku 17,5% RS*, 10 ml *lihu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h stát. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetrajodortuťnatanem draselným RS*. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstředěním. Spojené spodní vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a vytřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Chloroform se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l VS* a *chloroform R* se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$), se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{57{,}88\ .\ (20 - n)}{(100 - d)\ .\ m},$$

v němž značí:

d - ztrátu sušením v procentech,

n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech,

m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

Separandum.

† Streptokinasum

Streptokinasa

CAS 9002-01-1

Je to bílkovinný přípravek získaný z filtrátů kultury určitých kmenů hemolytických *streptokoků* skupiny C. Má schopnost se spojit s lidským plazminogenem a vytvořit aktivátor plazminogenu.

Látka je vyčištěná tak, aby před přidáním stabilizátoru nebo nosiče byla streptokinasová účinnost nejméně 600 m.j. na mikrogram dusíku. Obvykle obsahuje tlumivý roztok a může být stabilizována přídavkem vhodných látek, jako je lidský albumin.

Vlastnosti

Bílý prášek nebo bílá drobivá tuhá látka, hygroskopická. Je snadno rozpustná ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Do hemolyzační zkumavky umístěné ve vodní lázni při 37 °C se převede 0,5 ml citrátové lidské, psí nebo králičí plazmy, přidá se 0,1 ml roztoku zkoušené látky v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,2* obsahujícího 10 000 m.j. streptokinasové účinnosti v mililitru a 0,1 ml roztoku *trombinu lidského R* v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,2* obsahujícího 20 m.j. v mililitru a ihned se protřepe. Vytvoří se sraženina, která se rozpustí v průběhu 30 min. Celý postup je nutné opakovat při použití hovězí citrátové plazmy. V průběhu 60 min se vzniklá sraženina nerozpustí.

B. 0,6 g agaru se rozpustí v 50,0 ml *tlumivého roztoku barbitalového o pH 8,6 (1)* a zahřívá se, pokud není roztok čirý. Připraví se skleněné destičky o ploše 50 x 50 mm upevněné tak, aby byly průhledné, a zbaví se stop mastnoty. Na každou destičku se napipetují 4 ml roztoku agaru (viz níže) a ponechají se v horizontální poloze ochladit. Ve středu agaru se vyřízne jamka o průměru 6 mm a dostatečný počet jamek (nepřesahující 6) se vyřízne ve vzdálenosti 11 mm od střední jamky. Zbylý agar se z jamek odsaje hadičkou napojenou na vakuovou pumpu. Mikropipetou se do střední jamky napipetuje 80 μl kozího nebo králičího antistreptokinasového séra obsahujícího 10 000 jednotek antistreptokinasové účinnosti v mililitru. Do okolních jamek se napipetuje 80 μl roztoku zkoušené látky obsahující 125 000 m.j. streptokinasové účinnosti v mililitru. Destičky se umístí na 24 h do vlhké komory. Vytvoří se pouze jeden dobře zřetelný precipitační oblouk umístěný mezi jamkou se sérem a každou jamkou s roztokem zkoušené látky.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,8 až 7,5; měří se roztok zkoušené látky ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* obsahující 5000 m.j. streptokinasové účinnosti v mililitru.

Streptodornasa.

Zkoušený roztok. Zkoušená látka se rozpustí v *tlumivém roztoku imidazolovém o pH 6,5* v takovém množství, aby roztok obsahoval 150 000 m.j. streptokinasové účinnosti v mililitru.

Porovnávací roztok. Porovnávací přípravek streptodornasy kalibrovaný v mezinárodních jednotkách na mezinárodní standard streptodornasy se rozpustí v *tlumivém roztoku imidazolovém o pH 6,5* v takovém množství, aby roztok obsahoval 20 m.j. streptodornasové účinnosti v mililitru. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Do každé z osmi očíslovaných centrifugačních zkumavek se převede 0,5 ml roztoku *kyseliny deoxyribonukleové sodné soli R* (1 g/l) v *tlumivém roztoku imidazolovém o pH 6,5*. Do zkumavek č. 1 a č. 2 se přidá 0,25 ml *tlumivého roztoku imidazolového o pH 6,5*, 0,25 ml zkoušeného roztoku a ihned se přidají 3,0 ml *kyseliny chloristé R* (25 g $HClO_4$/l). Po promíchání se směs odstřeďuje 5 min při 3000 g_n a měří se absorbance (*2.2.25*) supernatantní tekutiny při 260 nm proti kontrolnímu roztoku, kterým je směs 1,0 ml *tlumivého roztoku imidazolového o pH 6,5* a 3,0 ml roztoku *kyseliny chloristé R* (25 g $HClO_4$/l) (absorbance A_1 a A_2). Do dalších šesti zkumavek (čísla 3 až 8) se převede 0,25 ml, 0,25 ml, 0,125 ml, 0,125 ml, 0 ml a 0 ml *tlumivého roztoku imidazolového o pH 6,5*. Do každé zkumavky se přidá 0,25 ml zkoušeného roztoku a 0 ml, 0 ml, 0,125 ml, 0,125 ml, 0,25 ml a 0,25 ml porovnávacího roztoku. Každá zkumavka se promíchá a zahřívá 15 min při 37 °C. Pak se do každé zkumavky přidají 3,0 ml *kyseliny chloristé R* (25 g $HClO_4$/l), promíchá se a odstřeďuje se. Měří se absorbance (*2.2.25*) supernatantních tekutin při 260 nm proti výše uvedenému kontrolnímu roztoku (absorbance A_3 až A_8):

$$(A_3 + A_4) - (A_1 + A_2) < \frac{(A_5 + A_6 + A_7 + A_8)}{2} - (A_3 + A_4) ,$$

(ekvivalent k maximu 10 m.j. streptodornasové účinnosti na 100 000 m.j. streptokinasové účinnosti).

Streptolysin. V hemolyzační zkumavce se rozpustí takové množství zkoušeného přípravku, aby v 0,5 ml směsi objemových dílů *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,2* a roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) (1 + 9) bylo 500 000 m.j. streptokinasové účinnosti. Pak se přidá 0,4 ml roztoku *thioglykolanu sodného R* (23 g/l) a směs se zahřívá 10 min ve vodní lázni při 37 °C. Přidá se 0,1 ml porovnávacího roztoku lidského antistreptolysinu O obsahujícího 5 m.j. v mililitru. Po 5 min zahřívání při 37 °C se přidá 1 ml *erytrocytů králičích suspenze R*, zahřívá se 30 min při 37 °C a odstřeďuje se při 1000 g_n. Stejným způsobem se připraví hemolyzační zkumavka, ve které je místo roztoku zkoušeného přípravku 0,5 ml směsi objemových dílů *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,2* a roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) (1 + 9). Měří se absorbance (*2.2.25*) supernatantních tekutin při 550 nm. Absorbance zkoušeného roztoku je nejvýše o 50 % vyšší než absorbance porovnávacího roztoku.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 4,0 %; suší se 24 h nad *oxidem fosforečným R* a při tlaku nepřevyšujícím 2,7 Pa.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne 1,0 ml roztoku obsahujícího množství zkoušeného přípravku odpovídající 20 000 m.j. streptokinasové účinnosti ve *vodě na injekci R*.

Neškodnost (*2.6.9*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků, vyhovuje zkoušce na neškodnost, při níž se během 15 s až 20 s každé myši vstříkne množství přípravku odpovídající 50 000 m.j. streptokinasové účinnosti, rozpuštěné v 0,5 ml *vody na injekci R*.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním schopnosti aktivovat přeměnu plazminogenu na plazmin se schopností referenčního přípravku streptokinasy kalibrovaného v mezinárodních jednotkách; tvorba plazminu se měří stanovením doby rozpuštění fibrinové sraženiny za daných podmínek.

Mezinárodní jednotka je streptokinasová účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je lyofilizovaná streptokinasa s laktosou. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Jestliže není předepsáno jinak, používá se pro přípravu roztoků a ředění při stanovení účinnosti tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,2 obsahující albumin hovězí R (30 g/l).

Zkoušený roztok. Připraví se roztok zkoušeného přípravku s přepokládaným obsahem 1000 m.j. streptokinasové účinnosti v mililitru.

Porovnávací roztok. Připraví se roztok referenčního přípravku látky obsahující 1000 m.j. streptokinasové účinnosti v mililitru.

Zkoušený roztok a porovnávací roztok se uchovávají ve vodě s ledem a použijí se do 6 h.

Připraví se tři ředění (1,5násobné) porovnávacího přípravku tak, aby nejdelší doba rozpuštění sraženiny byla menší než 20 min. Podobná ředění se připraví se zkoušeným roztokem.

Tyto roztoky se uchovávají ve vodě s ledem a použijí se do 1 h.

Připraví se 24 zkumavek o průměru 8 mm. Zkumavky se označí T1, T2 a T3 pro ředění zkoušeného roztoku a S1, S2 a S3 pro ředění porovnávacího roztoku. Pro každé ředění se použijí čtyři. Všechny zkumavky se umístí do vody s ledem a do každé se převede 0,2 ml příslušného ředění, 0,2 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 7,2* obsahujícího *albumin hovězí R* (30 g/l) a 0,1 ml roztoku *trombinu lidského R* obsahujícího 20 m.j. v mililitru. Zkumavky se přemístí do vodní lázně při 37 °C a nechají se 2 min temperovat. Automatickou pipetou se na dno první zkumavky převede 0,5 ml roztoku *euglobulinů lidských R* (10 g/l) a důkladně se promíchá. V intervalech 5 s se přidává 0,5 ml roztoku *euglobulinů lidských R* (10 g/l) do dalších zkumavek. Na stopkách se měří u každé zkumavky časový interval v sekundách mezi přidáním euglobulinů a rozpuštěním sraženiny.

Změřené časové intervaly se převedou na logaritmy a pomocí obvyklých statistických metod se vypočítá účinnost zkoušené látky v porovnání s účinností referenčního přípravku.

Stanovená účinnost je 90 % až 111 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovení účinnosti je 80 % až 125 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

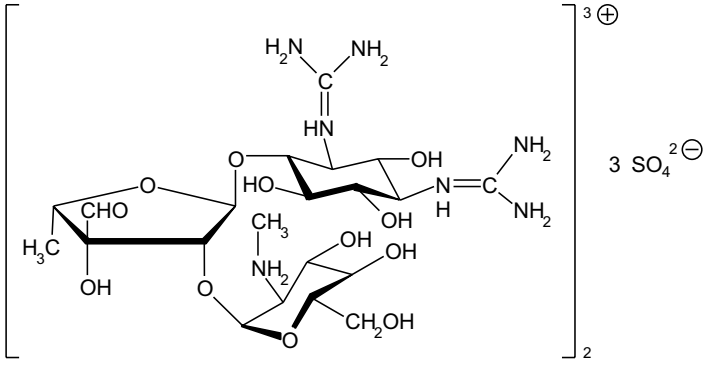
Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek streptokinasové účinnosti v miligramu, počítáno na vysušenou látku,
- název a množství každé přidané látky,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá pyrogenních látek,
- zda je látka vhodná pro výrobu parenterálních přípravků.

† Streptomycini sulfas

Streptomyciniumsulfat

Synonymum. Streptomycinium sulfuricum



$C_{42}H_{84}N_{14}O_{36}S_3$ M_r 1457,38 CAS 3810-74-0

Je to bis{N,N'-diamidinio-4-O-[5-deoxy-2-O-(2-deoxy-2-methylamonio-α-L-glukopyranosyl)-3--C-formyl-α-L-*lyxo*-furanosyl]-D-streptamonium}trisulfat produkovaný určitými kmeny *Streptomyces griseus* nebo se připravuje jiným způsobem. Mohou se přidat stabilizátory. Účinnost je nejméně 720 m.j. v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Výroba

Připravuje se výrobními postupy, které vylučují nebo omezují přítomnost látek snižujících krevní tlak, aby se prokázalo, že bude-li látka zkoušena, vyhoví následující zkoušce:

Neškodnost (*2.6.9*). Každé myši se vstříkne 1 mg zkoušené látky rozpuštěný v 0,5 ml *vody na injekci R.*

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v ethanolu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy o tloušťce 0,75 mm připravené z následující směsi: 0,3 g *karbomeru R* se smíchá s 240 ml *vody R* a nechá se 1 h stát za mírného protřepávání; pH se upraví postupným přidáváním *hydroxidu sodného zředěného RS* za stálého protřepávání na hodnotu 7 a přidá se 30 g *silikagelu H R*. Deska s vrstvou se 1 h zahřívá při 110 °C, nechá se zchladnout a ihned se použije.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *streptomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *kanamyciniummonosulfatu CRL*, 10 mg *neomyciniumsulfatu CRL* a 10 mg *streptomyciniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl z každého roztoku a vyvíjí se roztokem *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (70 g/l) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu a postříká se směsí stejných objemových dílů roztoku *dihydroxynaftalenu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *kyseliny sírové R* (460 g/l). Zahřívá se při 150 °C po dobu 5 min až 10 min. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. 5 mg až 10 mg se rozpustí ve 4 ml *vody R*, přidá se 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zahřívá se 4 min na vodní lázni. Přidá se *kyselina chlorovodíková zředěná RS* v mírném nadbytku a 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vzniká fialové zabarvení.

C. 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, přidá se 1 ml *1-naftolu RS* a 2 ml směsi stejných objemových dílů *chlornanu sodného RS* a *vody R;* vzniká červené zbarvení.

D. Asi 10 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zahřívá se 2 min na vodní lázni. Přidají se 2 ml roztoku *1-naftolu R* (5 g/l) v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS* a zahřívá se 1 min ve vodní lázni; vzniká slabě žluté zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S není zbarven intenzivněji než stupeň 3 z řady porovnávacích barevných roztoků nejvhodnější barvy (*2.2.2, Metoda II*). Nechá se 24 h stát chráněn před světlem při teplotě asi 20 °C. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II (*2.2.1*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 7,0; měří se roztok S.

Methanol. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 1,00 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 12,0 mg *methanolu R* se zředí *vodou R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m až 2,0 m a vnitřního průměru 2 mm až 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzenem kopolymerem R* (150 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při konstantní průtokové rychlosti 30 ml/min až 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Kolona se udržuje při konstantní teplotě mezi 120 °C až 140 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je nejméně o 50 °C vyšší než teplota kolony. Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztok. Plocha píku odpovídajícího methanolu na chromatogramu zkoušeného roztoku není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,3 %).

Streptomycin B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v čerstvě připravené směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *methanolu R* (3 + 97) a zředí se stejnou směsí na 5 ml. Zahřívá se 1 h v baňce pod zpětným chladičem, ochladí se, chladič se propláchne *methanolem R* a roztok se *methanolem R* zředí na 20 ml (roztok 10 g/l).

Porovnávací roztok. 36 mg *mannosy R* se rozpustí v čerstvě připravené směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *methanolu R* (3 + 97) a zředí se stejnou směsí na 5 ml. Zahřívá se 1 h v baňce pod zpětným chladičem, ochladí se, chladič se propláchne *methanolem R* a roztok se zředí *methanolem R* na 50 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml (roztok o koncentraci 0,3 g/l, vyjádřeno jako streptomycin B; 1 mg *mannosy R* odpovídá 4,13 mg streptomycinu B).

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl z každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *methanolu R* a *toluenu R* (25 + 25 + 50) po dráze 13 cm až 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se čerstvě připravenou směsí stejných objemových dílů roztoku *dihydroxynaftalenu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *kyseliny sírové R* 20% (*V/V*) a zahřívá se 5 min při 110 °C. Skvrna odpovídající streptomycinu B na chromatogramu zkoušeného roztoku není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (3,0 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 7,0 %, 1,000 g se 24 h suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 0,1 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Sírany. 18,0 % až 21,5 % (SO_4), počítáno na vysušenou látku. 0,250 g se rozpustí ve 100 ml *vody R* a pH roztoku se upraví *amoniakem 26 % R* na hodnotu 11. Přidá se 10,0 ml *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* a asi 0,5 mg *ftaleinpurpuru R*. Titruje se *edetanem disodným 0,1 mol/l VS*. Když se barva roztoku začíná měnit, přidá se 50 ml *lihu 96% R* a pokračuje se v titraci, dokud fialovo-modré zbarvení nezmizí.

1 ml roztoku *chloridu barnatého 0,1 mol/l VS* odpovídá 9,606 mg síranu (SO_4).

Kolorimetrická zkouška. Zkoušená látka a *streptomyciniumsulfat CRL* se 24 h suší při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 0,1 kPa. 0,100 g vysušené zkoušené látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml. Porovnávací roztok se připraví stejným způsobem s použitím 0,100 g vysušeného *streptomyciniumsulfatu CRL*. Po 5,0 ml z každého roztoku se převede odděleně do dvou odměrných baněk a do třetí se převede 5 ml *vody R*. Do každé baňky se přidá 5,0 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l RS* a zahřívá se přesně 10 min na vodní lázni. Chladí se v ledu přesně 5 min, přidají se 3 ml roztoku *síranu amonno-železitého R* (15 g/l) v *kyselině sírové 0,5 mol/l RS*, zředí se *vodou R* na 25,0 ml a promíchá se. Přesně za 20 min po přidání roztoku síranu amonno-železitého se měří absorbance (*2.2.25*) zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku ve 2cm vrstvě v maximu při 525 nm proti kontrolnímu roztoku připravenému s 5 ml *vody R*. Absorbance zkoušeného roztoku je nejméně 90,0 % absorbance porovnávacího roztoku.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před vlhkostí. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název a množství přidaného stabilizátoru,
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

† Strychni semen

N

Kulčibové semeno

Synonymum. Semen strychni

Je to usušené zralé semeno druhu *Strychnos nux vomica* L. Obsahuje nejméně 2,5 % alkaloidů -strychninu ($C_{21}H_{22}N_2O_2$; M_r 334,4) a brucinu ($C_{23}H_{26}N_2O_4$; M_r 394,5), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Velmi tvrdé, terčovité, na okraji většinou ztlustlé semeno o průměru 2 cm až 2,5 cm a tloušťce až 5 mm, šedožluté až zelenavě šedé, hedvábitě lesklé, krycí chlupy orientovány paprsčitě od středu k okraji semene. Uprostřed jedné, většinou prohloubené strany semene je patrné bradavčitě vyvýšené hilum, od něhož k okraji probíhá jen málo zřetelné žebro. Endosperm bělavě šedý, rohovitý; v okrouhlé, ploché, středem semene probíhající štěrbině je uložen klíček se dvěma plochými, široce srdčitými dělohami.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je nažloutle šedý až nazelenale šedý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky osemení, jejíž buňky jsou protáhlé v dlouhé, lesklé, těsně nad bází ohnuté chlupy; na vnitřní straně stěny chlupu je ztlustlá, jen zřídka anastomozující lišta, která se rozšiřuje směrem k bázi; bazální části chlupů hrubě tečkované; úlomky subepidermální vrstvy s buňkami silně ztlustlými, obliterovanými; úlomky endospermu s buňkami mnohohrannými, silně ztlustlými, s jemnými plasmodesmami; aleuronová zrna o průměru 15 μm až 30 μm.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (710) se smíchá s 10 ml *lihu R* 60% *(V/V)* a zahřívá se 15 min na vodní lázni pod zpětným chladičem, po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 10 mg *strychniniumnitratu R* a 10 mg *brucinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R*, *acetonu R* a *chloroformu R* (10 + 40 + 50) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu mohou být patrny další skvrny. Vrstva se postříká *jodobismutitanovým zkoumadlem R*. Hlavní skvrny na chromatogramu zkou-

šeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 1 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g práškované drogy (710) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení obsahu

3,000 g práškované drogy (710) se smíchá s 20,0 g *etheru prostého peroxidických látek R* a s 10,0 g *chloroformu R* a protřepává se 10 min. Pak se přidají 3,0 ml *uhličitanu sodného 1 mol/l RS* a protřepává se 1 h. Po 24 h stání se protřepává 15 min, přidá se 7 ml *vody R* a znovu se protřepe. Po oddělení vrstev se horní vrstva rychle zfiltruje přes chomáček vaty. 20,00 g filtrátu (odpovídá 2,00 g drogy) se na vodní lázni odpaří na asi 3 ml a převede se do dělicí nálevky. Baňka se promyje 5 ml *chloroformu R* a dvakrát 5 ml *etheru prostého peroxidických látek R.* Do dělicí nálevky se přidá 5,00 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*, 5 ml *vody R* a nadbytek *etheru prostého peroxidických látek R.* Protřepává se 2 min, spodní vrstva se převede do kuželové baňky, pak se protřepává dvakrát 5 ml *vody R*. Ke spojeným spodním vrstvám se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny zbarvení.

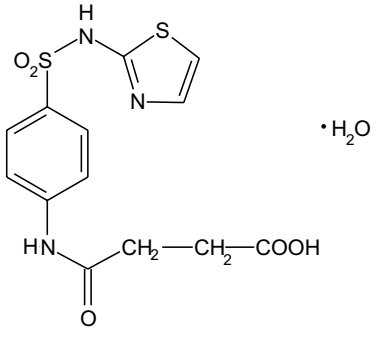
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 36,44 mg alkaloidů, počítáno jako průměr součtu strychninu ($C_{21}H_{22}N_2O_2$) a brucinu ($C_{23}H_{26}N_2O_4$).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněno před světlem.
Separandum.

† Succinylsulfathiazolum

Sukcinylsulfathiazol



$C_{13}H_{13}N_3O_5S_2 \cdot H_2O$ M_r 373,40

M_r bezvodého 355,38 CAS 116-43-8

Je to monohydrát N-[4-(2-thiazolylsulfamoyl)fenyl]amidu butandiové kyseliny. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{13}N_3O_5S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v acetonu a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sukcinylsulfathiazolu CRL*. Jestliže spektra zkoušené látky a referenční látky v pevném stavu jsou rozdílná, rozpustí se odděleně obě látky v horké *vodě R* a nechají se krystalizovat. Krystaly se vysuší opatrně mezi dvěma filtračními papíry, připraví se nové tablety a zaznamenají se nová spektra.

B. Ke 2 g se přidá 10 ml *vody R* a 10 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 10 min se vaří. Ochladí se a upraví se pH na hodnotu 3,0 *kyselinou chlorovodíkovou RS*. Ochladí se, upraví se pH na hodnotu 7,0 *hydrogenuhličitanem sodným RS* a zfiltruje se. Sraženina se promyje *vodou R* a vysuší se při 100 °C až 105 °C; taje (*2.2.14*) při 196 °C až 204 °C. Kapilára obsahující sraženinu se umístí do lázně při 190 °C.

C. 0,1 g se zahřeje ve zkumavce nad malým plamenem; vyvíjejí se páry, které zbarví *papír s octanem olovnatým R* černě.

D. 0,1 g se převede do asi 30ml zkumavky z borosilikátového skla, přidá se 0,5 g *hydrochinonu R* a 1 ml *kyseliny sírové R*. 10 min se zahřívá v glycerinové lázni při 135 °C za promíchávání do vzniku homogenní tekutiny na počátku zahřívání. Ochladí se a umístí se do ledové vody a opatrně se přidá za třepání 15 ml *vody R*. Poté se přidá 5 ml *toluenu R*, třepe se 5 s až 10 s a nechá se 2 min stát; oddělení vrstev podporuje míchání. Horní (toluenová) vrstva je intenzivně růžově zbarvená.

E. Asi 10 mg sraženiny ze zkoušky B se rozpustí v 200 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l RS*. 2 ml tohoto roztoku vyhovují zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*) za tvorby oranžové sraženiny.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 15 ml *vody R;* roztok je čirý *(2.2.1.)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_4$ nebo $HŽ_4$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. Ke 2,0 g se přidá 20 ml *vody R*, 30 min se nepřetržitě třepe a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebují nejvýše 2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Sulfathiazol a jiné primární aromatické aminy. 20 mg se v odměrné baňce na 50 ml rozpustí ve směsi 3,5 ml *vody R*, 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 25 ml *lihu 96% R* předem ochlazené na 15 °C. Baňka se ihned umístí do ledové vody, přidá se 1 ml roztoku *dusitanu*

sodného R (2,5 g/l), nechá se 3 min stát, přidá se 2,5 ml roztoku *kyseliny amidosírové R* (40 g/l) a nechá se 5 min stát. Přidá se 1 ml roztoku *naftylethylendiamoniumdichloridu R* (4 g/l) a zředí se *vodou R* na 50 ml. Absorbance (*2.2.25)* roztoku měřená při 550 nm není větší než absorbance současně a stejným způsobem připravené směsi 1,5 ml roztoku obsahujícího 10 mg *sulfathiazolu R* a 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* ve 100 ml, 2 ml *vody R*, 6 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 25 ml *lihu 96% R.*

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. 4,0 % až 5,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 100 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (1 + 2) a zahřívá se 1 h pod zpětným chladičem. Provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,54 mg $C_{13}H_{13}N_3O_5S_2$.

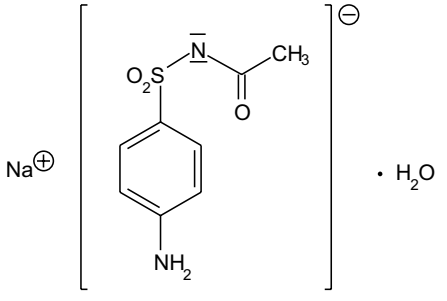
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfacetamidum natricum

Sodná sůl sulfacetamidu

Synonymum. Sulfacetamidum solubile



$C_8H_9N_2NaO_3S \cdot H_2O$ M_r 254,24 CAS 6209-17-2
M_r bezvodého 236,22

Je to monohydrát sodné soli N-sulfanilylacetamidu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_9N_2NaO_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, těžce rozpustná v ethanolu, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a F.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 0,1 g se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,0* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,0* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 255 nm. Specifická absorbance v maximu je 660 až 720, počítáno na bezvodou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli sulfacetamidu CRL*.

C. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 6 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zfiltruje se. Sraženina se promyje malým množstvím *vody R* a suší se 4 h při 100 °C až 105 °C; taje (*2.2.14*) při 181 °C až 185 °C.

D. 0,1 g sraženiny ze zkoušky C se rozpustí v 5 ml *lihu 96% R*, přidá se 0,2 ml *kyseliny sírové R* a zahřeje se; je cítit pach ethylacetatu.

E. Asi 1 mg sraženiny ze zkoušky C se rozpustí zahřátím v 1 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*) za tvorby oranžově červené sraženiny.

F. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkouškám na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_4$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 8,0 až 9,5; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 15 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *sulfanilamidu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *sulfanilamidu R* se rozpustí v 10 ml zkoušeného roztoku.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu R*, *vody R* a *1-butanolu R* (10 + 25 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *dimethylaminobenzaldehydem RS2*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Sírany (*2.4.13*). 2,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 25 ml. Přidá se 25 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 30 min se třepe a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml filtrátu získaného ve zkoušce Sírany vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 6,0 % až 8,0 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 50 ml *vody R* a ochladí se v ledové vodě. Provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 23,62 mg $C_8H_9N_2NaO_3S$.

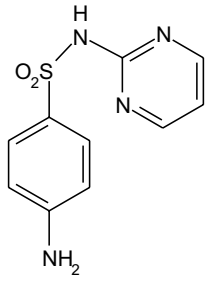
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Sulfadiazinum

Sulfadiazin



$C_{10}H_{10}N_4O_2S$ M_r 250,27 CAS 68-35-9

Je to 4-amino-N-(2-pyrimidinyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{10}N_4O_2S$.

Vlastnosti

Bílý, žlutavě bílý nebo narůžověle bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v acetonu, velmi těžce rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 255 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfadiazinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 3 g se umístí do suché zkumavky, která se nakloní do úhlu 45 °, dno zkumavky se ponoří do silikonové olejové lázně a zahřeje se na asi 270 °C; látka se rozkládá, vzniká bílý nebo nažloutle bílý sublimát, který po rekrystalizaci z *toluenu R* a sušení při 100 °C taje (*2.2.14*) při 123 °C až 127 °C.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,8 g se rozpustí ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 20 mg se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,10 g se rozpustí v 0,5 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *methanolem R* na 5,0 ml. Není-li roztok čirý, mírně se zahřívá do rozpuštění.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfadiazinu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,25 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *nitromethanu R* a *dioxanu R* (3 + 5 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 50 ml *vody R* a ochladí se v ledové vodě. Provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,03 mg $C_{10}H_{10}N_4O_2S$.

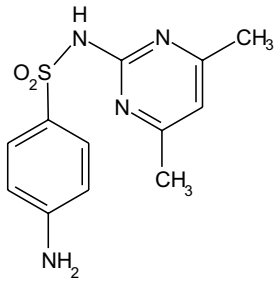
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Sulfadimidinum

Sulfadimidin



$C_{12}H_{14}N_4O_2S$ M_r 278,33 CAS 57-68-1

Je to 4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{14}N_4O_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v etheru, dobře rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 197 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfadimidinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 3 g se umístí do suché zkumavky, která se nakloní do úhlu 45 °C, dno zkumavky se ponoří do silikonové olejové lázně a zahřeje se na asi 270 °C; látka se rozkládá, vzniká bílý nebo nažloutle bílý sublimát, který po rekrystalizaci z *toluenu R* a sušení při 100 °C taje (*2.2.14*) při 150 °C až 154 °C.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí ve směsi 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 20 mg se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,10 g se rozpustí v 0,5 ml *amoniaku 26% R* a zředí se *methanolem R* na 5,0 ml. Není-li roztok čirý, mírně se zahřívá do rozpuštění.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfadimidinu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,25 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *nitromethanu R* a *dioxanu R* (3 + 5 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 50 ml *vody R* a ochladí se v ledové vodě. Provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

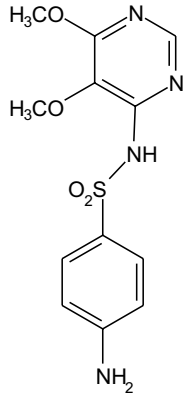
1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,83 mg $C_{12}H_{14}N_4O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfadoxinum

Sulfadoxin



$C_{12}H_{14}N_4O_4S$ M_r 310,33 CAS 2447-57-6

Je to 4-amino-N-(5,6-dimethoxy-4-pyrimidinyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{14}N_4O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 198 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfadoxinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,5 g se rozpustí v 1 ml roztoku *kyseliny sírové R* 40% (*V/V*) a mírně se zahřeje. Pokračuje se v zahřívání do vzniku krystalické sraženiny (asi 2 min). Ochladí se, přidá se 10 ml *hydroxidu*

sodného zředěného RS, opět se ochladí, přidá se 25 ml *etheru R* a 5 min se třepe. Etherová vrstva se oddělí, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje. Filtrát se odpaří zahříváním ve vodní lázni. Zbytek po odpaření taje (*2.2.14*) při 80 °C až 82 °C nebo při 90 °C až 92 °C.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfadoxinu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *nitromethanu R* a *dioxanu R* (3 + 5 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

S 0,250 g se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

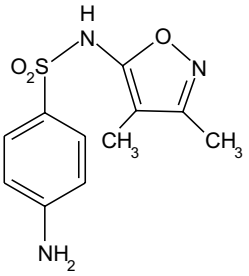
1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 31,03 mg $C_{12}H_{14}N_4O_4S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfafurazolum

Sulfafurazol



$C_{11}H_{13}N_3O_3S$ M_r 267,30 CAS 127-69-5

Je to 4-amino-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{13}N_3O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý prášek nebo krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 197 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfafurazolu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. K 0,5 g se přidá 1 ml roztoku *kyseliny sírové R* 40% (*V/V*) a zahřívá se nad mírným plamenem do rozpuštění. Pokračuje se nepřetržitě v zahřívání až do vzniku krystalické sraženiny (asi 2 min). Ochladí se a přidá se 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS.* Po ochlazení se roztok třepe 5 min s 25 ml *etheru R.* Etherová vrstva se oddělí, vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Rozpouštědlo se odpaří zahříváním na vodní lázni; zbytek taje (*2.2.14*) při 119 °C 123 °C.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS.* 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,4 g se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$, $HŽ_6$ nebo $ZŽ_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfafurazolu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,25 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 25 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 50 ml *acetonu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za použití roztoku *modři thymolové R* (4 g/l) v *methanolu R* jako indikátoru.

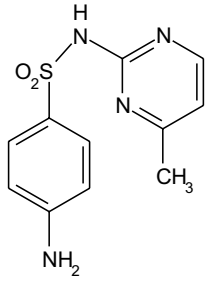
1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,73 mg $C_{11}H_{13}N_3O_3S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfamerazinum

Sulfamerazin



$C_{11}H_{12}N_4O_2S$ M_r 264,30 CAS 127-79-7

Je to 4-amino-N-(4-methyl-2-pyrimidinyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{12}N_4O_2S$.

Vlastnosti

Bílý, žlutavě bílý nebo narůžověle bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 235 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfamerazinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 3 g se umístí do suché zkumavky, která se nakloní do úhlu 45°, dno zkumavky se ponoří do silikonové olejové lázně a zahřeje se na asi 270 °C; látka se rozkládá, vzniká bílý nebo nažloutle bílý sublimát, který po rekrystalizaci z *toluenu R* a sušení při 100 °C taje (*2.2.14*) při 157 °C až 161 °C.

D. Asi 20 mg se rozpustí v 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a přidá se 1 ml *vody R*. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,8 g se rozpustí ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_4$, $HŽ_4$ nebo $ZŽ_4$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 40 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *sulfamerazinu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *nitromethanu R* a *dioxanu R* (3 + 5 + 40 + 50) po dráze 15 cm.

Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí ve směsi 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 50 ml *vody R* a ochladí se v ledové vodě. Provede se stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

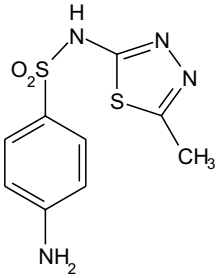
1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 26,43 mg $C_{11}H_{12}N_4O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfamethizolum

Sulfamethizol



$C_9H_{10}N_4O_2S_2$ M_r 270,32 CAS 144-82-1

Je to 4-amino-N-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{10}N_4O_2S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96% a velmi těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 210 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfamethizolu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 50 mg se rozpustí ve 4 ml *methanolu R*, přidá se 0,2 ml roztoku *octanu měďnatého R* (40 g/l). Vznikne vločkovitá žlutozelená sraženina, která se změní na tmavě zelenou.

D. Asi 5 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,30 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 30 mg *sulfamethizolu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 20 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

S 0,2500 g se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

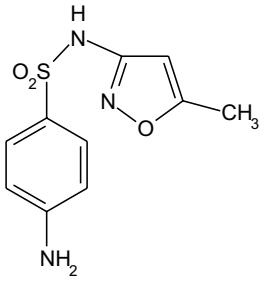
1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,03 mg $C_9H_{10}N_4O_2S_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfamethoxazolum

Sulfamethoxazol



$C_{10}H_{11}N_3O_3S$ M_r 253,28 CAS 723-46-6

Je to 4-amino-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_{11}N_3O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích hydroxidu sodného.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 169 °C až 172 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfamethoxazolu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfamethoxazolu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,25 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *nitromethanu R* a *dioxanu R* (3 + 5 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na

chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

S 0,2000 g se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,33 mg $C_{10}H_{11}N_3O_3S$.

Uchovávání

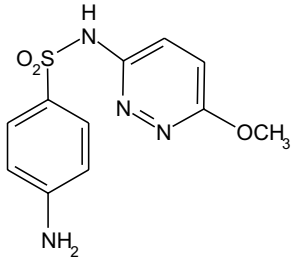
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

---

† Sulfamethoxypyridazinum

Sulfamethoxypyridazin



$C_{11}H_{12}N_4O_3S$ M_r 280,30 CAS 80-35-3

Je to 4-amino-N-(6-methoxy-3-pyridazinyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{12}N_4O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý, krystalický prášek, pomalu se zbarvující vlivem světla. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 180 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfamethoxypyridazinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 0,5 g se rozpustí v 1 ml *kyseliny sírové R* 40% (*V/V*) a mírně se zahřeje. Pokračuje se v zahřívání do vzniku krystalické sraženiny (asi 2 min). Ochladí se, přidá se 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, opět se ochladí, přidá se 25 ml *etheru R* a 5 min se třepe. Oddělí se etherová vrstva, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Roztok se odpaří zahříváním ve vodní lázni. Olejový zbytek ochlazením přejde na krystaly, je-li třeba třením skleněné tyčinky o stěnu nádoby; zbytek taje (*2.2.14*) při 102 °C až 106 °C.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 15 ml *vody R*. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_4$ nebo $HŽ_4$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfamethoxypyridazinu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 2,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *2-propanolu R* a *ethylacetatu R* (1 + 9 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

S 0,2500 g se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,03 mg $C_{11}H_{12}N_4O_3S$.

Uchovávání

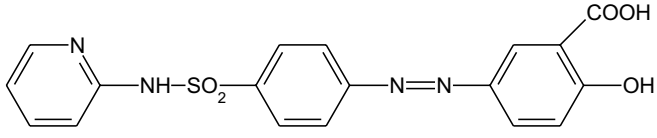
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Sulfasalazinum

1998

Sulfasalazin



$C_{18}H_{14}N_4O_5S$ M_r 398,39 CAS 599-79-1

Je to kyselina 5-{[4-(2-pyridylsulfamoyl)fenyl]azo}salicylová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 101,5 % sloučeniny $C_{18}H_{14}N_4O_5S$.

Vlastnosti

Světle žlutý nebo hnědavě žlutý jemný prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.

Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 40 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 250,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se převede do 100ml odměrné baňky obsahující asi 70 ml *vody R*. Přidá se 20,0 ml *kyseliny octové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Měří se absorbance při 230 nm až 400 nm *(2.2.25);* roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 238 nm a 359 nm. Poměr absorbance změřené v maximu při 359 nm k absorbanci změřené v maximu při 238 nm je 1,2 až 1,3.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfasalazinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, před postřikem *chloridem železitým RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 10 mg se přidá 20 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 3 g granulovaného *zinku R* a vaří se do odbarvení roztoku. Ochladí se a nechá se 15 min stát. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *vody R*, 0,2 ml *dusitanu sodného RS*, po 1 min až 2 min se přidá 10 ml roztoku *2-naftolu R* (20 g/l) v *hydroxidu sodném zředěném RS;* vznikne intenzivní oranžově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) na 10 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *sulfasalazinu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) na 10 ml.

Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) na 10 ml.

Porovnávací roztok (d). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) na 20 ml.

Porovnávací roztok (e). 10 mg *kyseliny salicylové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *lihu 96% R* (1 + 4) a zředí se stejnou směsí na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *acetonu R* a *chloroformu R* (5 + 30 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu horkého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2 %); nejvýše tři takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %) a nejvýše jedna z těchto skvrn je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1 %). Vrstva se postříká směsí 3 ml *chloridu železitého RS1* a 7 ml *vody R* a ihned se pozoruje v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající kyselině salicylové není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (1 %).

Chloridy (*2.4.4*). K 1,25 g se přidá 50 ml *vody destilované R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, ochladí se a zfiltruje. K 20 ml filtrátu se přidá 1 ml *kyseliny dusičné R*, nechá se 5 min stát a filtruje se do získání čirého filtrátu. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (140 μg/g).

Sírany (*2.4.13*). K 20 ml filtrátu získaného ve zkoušce Chloridy se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*, nechá se 5 min stát a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na sírany (400 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se převede do 1000ml odměrné baňky obsahující asi 750 ml *vody R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny octové 0,1 mol/l RS* a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 0,150 g *sulfasalazinu CRL*. Měří se absorbance (*2.2.25*) obou roztoků v maximu při 359 nm.

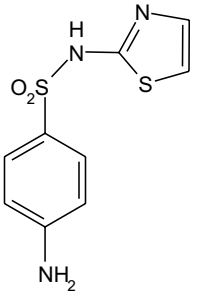
Vypočítá se obsah $C_{18}H_{14}N_4O_5S$ za použití naměřených absorbancí a koncentrací roztoků.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfathiazolum

Sulfathiazol



$C_9H_9N_3O_2S_2$ M_r 255,31 CAS 72-14-0

Je to 4-amino-N-(2-thiazolyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje nejméně 99,0 % a nejvýše 101,0 % sloučeniny $C_9H_9N_3O_2S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 200 °C až 203 °C. Tání může nastat při asi 175 °C, následuje tuhnutí a druhé tání při 200 °C až 203 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje s tabletou *sulfathiazolu CRL*. Jestliže spektra zkoušené látky a referenční látky v pevném stavu jsou

rozdílná, rozpustí se odděleně obě látky v *lihu 96% R*, odpaří se ve vakuu a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 10 mg se rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS* a přidá se 0,5 ml *síranu měďnatého RS;* vznikne šedavě modrá nebo purpurová sraženina.

E. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS;* roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_4$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,0 g se přidá 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se rychle ochladí na 20 °C a zfiltruje se. K 25 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu H R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 96% R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 96% R* (1 + 9) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfathiazolu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 96% R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *sulfanilamidu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *lihu 96% R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% RS* a *1-butanolu R* (18 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C a postříká se roztokem *dimethylaminobenzaldehydu R* (1 g/l) v *lihu 96% R* obsahujícím 1 % (*V/V*) *kyseliny chlorovodíkové R*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

S 0,200 g se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

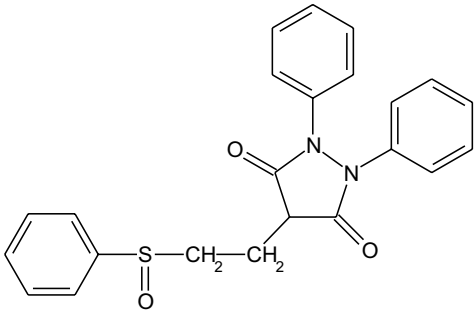
1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,53 mg $C_9H_9N_3O_2S_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Sulfinpyrazonum

Sulfinpyrazon



$C_{23}H_{20}N_2O_3S$ M_r 404,48 CAS 57-96-5

Je to 1,2-difenyl-4-(2-fenylsulfinylethyl)-3,5-pyrazolidindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{23}H_{20}N_2O_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 131 °C až 135 °C.

B. 30,0 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,01 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 20,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 260 nm. Specifická absorbance v maximu je 530 až 580.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfinpyrazonu CRL*.

D. Asi 10 mg se rozpustí ve 3 ml *acetonu R* a přidá se směs 0,2 ml *chloridu železitého RS2* a 3 ml *vody R;* vzniká červené až fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku v acetonu. 1,25 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 420 nm ve 4cm vrstvě je nejvýše 0,10.

Vzhled roztoku v hydroxidu sodném 1 mol/l. 1,25 g se rozpustí mírným zahřátím ve 25 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*. Roztok je čirý (*2.2.1*). Absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku měřená při 420 nm ve 4cm vrstvě je nejvýše 0,15.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm. Deska s vrstvou se vystaví v chromatografické komoře působení par *kyseliny octové ledové R* a po 10 min se vyjme z komory a zahřívá se 40 min při 60 °C. Vrstva se chladí 10 min v proudu dusíku. *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 ml zkoušeného roztoku se zředí *acetonem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *sulfinpyrazonu nečistoty A CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *sulfinpyrazonu nečistoty B CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (e). 5 ml porovnávacího roztoku (d) se zředí *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se v atmosféře dusíku odděleně nanese po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *chloroformu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající sulfinpyrazonu nečistotě A a sulfinpyrazonu nečistotě B není intenzivnější než odpovídající skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %) a chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (2,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (1,0 %) nebo porovnávacího roztoku (e) (1,0 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a dvou jmenovaných skvrn, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve 25 ml *acetonu R*, přidá se 0,5 ml roztoku *modři bromthymolové RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení na modré.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 40,45 mg sloučeniny $C_{23}H_{20}N_2O_3S$.

Uchovávání

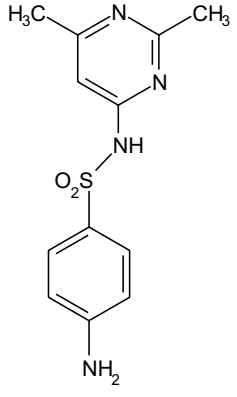
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 1,2-difenyl-4-(2-fenylsulfonylethyl)-3,5-pyrazolidindion,
B. 1,2-difenyl-4-(2-fenylthioethyl)-3,5-pyrazolidindion.

† Sulfisomidinum

Sulfisomidin



$C_{12}H_{14}N_4O_2S$ M_r 278,33 CAS 515-64-0

Je to 4-amino-N-(2,6-dimethyl-4-pyrimidinyl)benzensulfonamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{14}N_4O_2S$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutle bílý prášek nebo krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v acetonu a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 240 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulfisomidinu CRL*.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. 50 mg se zahřátím rozpustí ve 4 ml *methanolu R*, ochladí se a zfiltruje. K filtrátu se přidá 0,2 ml roztoku *octanu měďnatého R* (40 g/l); vznikne nažloutle zelené zbarvení.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*. 1 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok bez dalšího okyselení vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve směsi 5 ml roztoku *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R;* roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$, $HŽ_5$ nebo $ZŽ_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,25 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 25 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při asi 70 °C, potom se 15 min chladí v ledové vodě a zfiltruje se. K 20 ml filtrátu se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulfisomidinu CRL* se rozpustí ve 3 ml směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) a zředí se stejnou směsí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,25 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 48) na 50 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1*, *vody R*, *nitromethanu R* a *dioxanu R* (3 + 5 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

S 0,2500 g se provede stanovení dusíku v primárních aromatických aminech (*2.5.8*) za elektrometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml *dusitanu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,83 mg $C_{12}H_{14}N_4O_2S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Sulfur ad usum externum

1998

Síra pro zevní použití

S A_r 32,07 CAS 7704-34-9

Obsahuje 99,0 % až 101,0 % S.

Vlastnosti

Žlutý prášek. Je prakticky nerozpustná ve vodě, dobře rozpustná v sirouhlíku, těžce rozpustná v rostlinných olejích.

Velikost většiny částic není větší než 20 µm a téměř všechny částice nejsou větší než 40 µm.

Taje při asi 120 °C.

Zkoušky totožnosti

A. Zapálena za přítomnosti vzduchu hoří modrým plamenem za vzniku oxidu siřičitého, který barví navlhčený *papír lakmusový modrý R* červeně.

B. 0,1 g se zahřívá s 0,5 ml *bromové vody R* až do odbarvení. Přidá se 5 ml *vody R* a zfiltruje se. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 5 g se přidá 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R*. Nechá se 30 min stát za častého protřepávání a zfiltruje se.

Vzhled roztoku. Roztok S je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Pach (*2.3.4*). Zkoušená látka není cítit po sirovodíku.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 5 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS1;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně. Přidá se 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS;* roztok je bezbarvý. Přidá se 0,15 ml *červeně methylové RS;* roztok se zbarví oranžově červeně.

Chloridy (*2.4.4*). 5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Sírany (*2.4.13*). 15 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na sírany (100 µg/g).

Sulfidy. K 10 ml roztoku S se přidají 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a 1 ml čerstvě připraveného roztoku *dusičnanu olovnatého R* (1,6 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a protřepe se. Po 1 min není zbarvení roztoku intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku současně připraveného za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*, 9 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 2 ml *tlumivého roztoku o pH 3,5* a 1,2 ml *zkoumadla thioacetamidového R*.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se spalování organických látek v kyslíku (*2.5.10*) v 1000ml spalovací baňce za použití 60,0 mg zkoušené látky. Spalné produkty se absorbují ve směsi 5 ml *peroxidu vodíku zředěného RS* a 10 ml *vody R*. Roztok se zahřeje k varu, opatrně se 2 min vaří a ochladí se. Přidá se 0,2 ml *fenolftaleinu RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* z bezbarvého do červeného zbarvení. Provede se slepá zkouška.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 1,603 mg S.

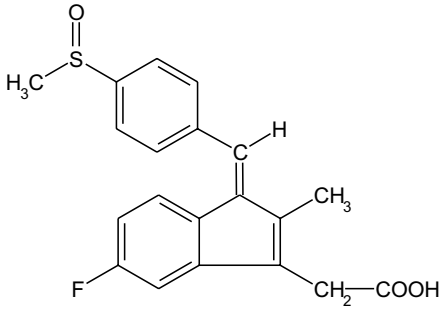
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Sulindacum

1998

Sulindak



$C_{20}H_{17}FO_3S$ M_r 356,41 CAS 38194-50-2

Je to kyselina (*Z*)-{5-fluor-2-methyl-1-[4-(methylsulfinyl)benzyliden]-1-*H*-inden-3-yl}octová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{20}H_{17}FO_3S$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 182 °C až 186 °C.

B. 50 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 0,3% (*V/V*) v *methanolu R* a zředí se stejným roztokem na 100,0 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodí-*

kové R 0,3% (*V/V*) v *methanolu R* na 50,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 284 nm, 327 nm, a prodlevu při asi 258 nm. Poměr absorbance změřené v maximu při 284 nm k absorbanci změřené v maximu při 327 nm je 1,10 až 1,20.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulindaku CRL*. Jestliže spektra vykazují rozdíly, látky se rozpustí odděleně v minimálním objemu horkého *methanolu R*, odpaří se do sucha a zaznamenají se nová spektra.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *sulindaku CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *diflunisalu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí porovnávacím roztokem (a) na 2 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *dichlormethanu R* a *acetonu R* (1 + 49 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší v proudu teplého vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

E. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do vzniku téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se ochladit, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* do odbarvení roztoku a zfiltruje se. K 1,0 ml filtrátu se přidá čerstvě připravená směs 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS,* promíchá se a nechá 5 min stát. Zbarvení tohoto roztoku se porovná s kontrolním roztokem získaným za stejných podmínek při slepé zkoušce; zkoušený roztok je žlutý a kontrolní roztok je červený.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,10 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *sulindaku CRL* obsahujícího 0,5 % *E*-izomeru se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony 0,25 m dlouhé a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *kyseliny octové ledové R, lihu 96% R, ethylacetatu R* a *chloroformu prostého ethanolu R* (1 + 4 + 100 + 400). Průtoková rychlost je 2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající dvojná-

sobku retenčního času hlavního píku. Na získaném chromatogramu je hlavní pík odpovídající sulindaku a pík odpovídající *E*-izomeru s retenčním časem vztaženým k sulindaku asi 1,75.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl porovnávacího roztoku (b). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího *E*-izomeru není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); plocha žádného píku, kromě hlavního píku a píku odpovídajícího *E*-izomeru, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %); součet ploch všech těchto píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C a tlaku nepřevyšujícím 700 Pa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *methanolu R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

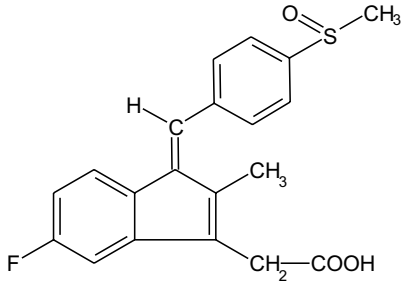
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 35,64 mg $C_{20}H_{17}FO_3S$.

Uchovávání

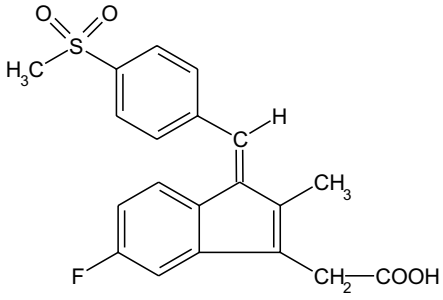
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

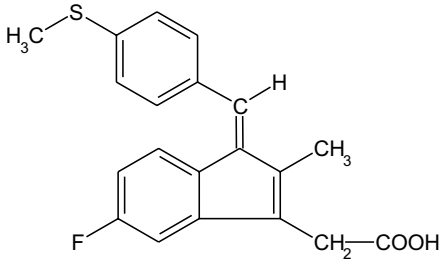
Nečistoty



A. kyselina (*E*)-{5-fluor-2-methyl-1-[4-(methylsulfinyl)benzyliden]-1*H*- inden-3-yl}octová,



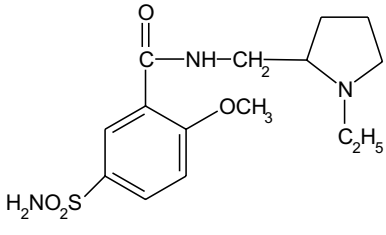
B. kyselina (*Z*)-{5-fluor-2-methyl-1-[4-(methylsulfonyl)benzyliden]-1*H*-inden-3-yl}octová,



C. kyselina (*Z*)-{5-fluor-2-methyl-1-[4-(methylthio)benzyliden]-1*H*-3-yl}octová.

† Sulpiridum

Sulpirid



$C_{15}H_{23}N_3O_4S$ M_r 341,42 CAS 15676-16-1

Je to (*RS*)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-methoxy-5-sulfamoylbenzamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{23}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích minerálních kyselin a alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 177 °C až 181 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *sulpiridu CRL*.

C. Chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky A, viz Zkoušky na čistotu, se pozorují v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 1 mg v porcelánové misce se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a 0,05 ml *formaldehydu R*. Roztok v ultrafialovém světle při 365 nm vykazuje modrou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí *v kyselině octové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ (*2.2.2, Metoda I*).

Příbuzné látky.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy *silikagelu HF_{254}R*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *sulpiridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *sulpiridu nečistoty A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 25 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, dioxanu R, methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 10 + 14 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle pro zkoušku totožnosti C. Potom se postříká *ninhydrinem RS* a 15 min se zahřívá při 100 °C až 105 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) skvrna odpovídající hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %).

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 3,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *sulpiridu CRL* a 10 mg *sulpiridu nečistoty B CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,15 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm) ve formě sférických mikročástic,
- mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů *acetonitrilu R*, *methanolu R* a roztoku, který obsahuje *dihydrogenfosforečnan draselný R* (68 g/l), *oktansulfonan sodný R* (0,76 g/l) a jehož

pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na hodnotu pH 3,3 (10 + 10 + 80). Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,

- spektrofotometrického detektoru, 240 nm,
- injektorové smyčky.

Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) nebyla menší než 5 % celé stupnice zapisovače. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 2,5.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 2,5násobku retenčního času sulpiridu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %).

Chloridy *(2.4.4)*. K 1,0 g se přidá 1,7 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *vody R;* roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 μg/g).

Železo (*2.4.9*). 1,0 g se žíhá v křemenném kelímku. Ke zbytku se přidá 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS,* 3 ml *vody R* a 0,1 ml *kyseliny dusičné R* a několik minut se zahřívá na vodní lázni. Roztok se převede do zkumavky, kelímek se opláchne 4 ml *vody R*, roztok a promývací tekutina se spojí a zředí se *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 80 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 34,14 mg $C_{15}H_{23}N_3O_4S$.

Uchovávání

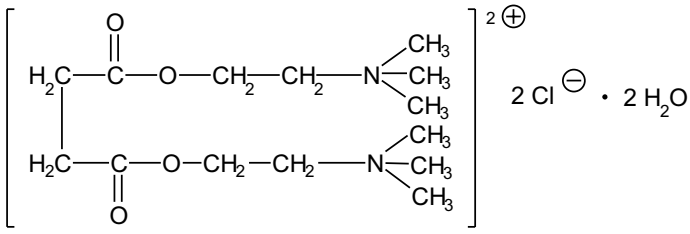
Separandum.

Nečistoty

A. 2-aminomethyl-1-ethylpyrrolidin,
B. methyl-5-sulfamoyl-2-methoxybenzoat,
C. ethyl-5-sulfamoyl-2-methoxybenzoat,
D kyselina 5-sulfamoyl-2-methoxybenzoová,
E. 5-sulfamoyl-2-methoxybenzamid,
F. N-oxid 5-sulfamoyl-N-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2-methoxybenzamidu,
G. 5-sulfamoyl-N-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2-hydroxybenzamid.

† Suxamethonii chloridum

Suxamethoniumchlorid



$C_{14}H_{30}Cl_2N_2O_4 \cdot 2H_2O$ M_r 397,34 CAS 6101-15-1

M_r bezvodého 361,31

Je to dihydrát N,N′-(sukcinyldioxydiethyl)bis(trimethylamonium)dichloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{30}Cl_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 160 °C, stanoví se bez předchozího sušení.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *suxamethoniumchloridu CRL*.

B. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 9 ml *vody R*, 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 30 ml *Reineckovy soli RS;* vznikne růžová sraženina. Nechá se 30 min stát, zfiltruje se, promyje *vodou R*, *lihem 96% R*, potom *etherem R* a vysuší se při 80 °C. Teplota tání (*2.2.14*) sraženiny je 180 °C až 185 °C.

C. Asi 25 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml roztoku *chloridu kobaltnatého R* (10 g/l) a 0,1 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS;* vznikne zelené zbarvení.

D. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 5,0; měří se roztok připravený zředěním 1 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Choliniumchlorid. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R1*.

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,4 g *suxamethoniumchloridu CRL* a 2 mg *choliniumchloridu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se po dráze 15 cm horní vrstvou mobilní fáze připravené takto: směs objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *1-butanolu R* (10 + 40 + 50) se 10 min třepe a potom se nechá stát. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným RS.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna odpovídající choliniumchloridu na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 8,0 % až 10,0 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1500 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 15 ml *acetanhydridu R* a 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití *violeti krystalové RS* jako indikátoru do modrozeleného zbarvení.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,07 mg $C_{14}H_{30}Cl_2N_2O_4$.

Uchovávání

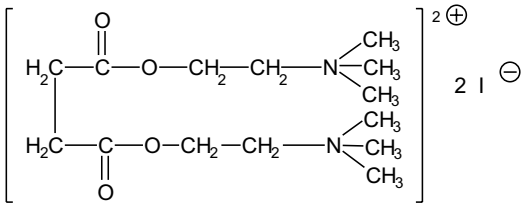
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Suxamethonii jodidum

N

Suxamethoniumjodid

Synonymum. Suxamethonium iodatum



$C_{14}H_{30}I_2N_2O_4$ M_r 544,21 CAS 541-19-5

Je to N,N′-(sukcinyldioxydiethyl)bis(trimethylamonium)dijodid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{30}I_2N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Taje při asi 245 °C, bez předchozího sušení.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *suxamethoniumjodidu CRL*. Měří se látky ve formě tablet s *bromidem draselným R.*

B. Asi 0,2 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok se použije také ke zkoušce D. K polovině roztoku se přidá 0,1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 5 ml roztoku *trinitrofenolu R* (10 g/l) v *lihu 96 % R* a nechá se stát v chladu. Vyloučená žlutá krystalická sraženina se odfiltruje, promyje malým množstvím studené *vody R* a suší se 1 h při 105 °C; taje při 158 °C až 160 °C.

C. Asi 30 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml roztoku *chloridu kobaltnatého R* (10 g/l) v *methanolu R* a 0,1 ml *hexakyanoželeznatanu draselného RS;* vznikne zelené zbarvení.

D. Druhá polovina roztoku ze zkoušky B vyhovuje zkoušce na jodidy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). 4 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml; roztok je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 6,5; měří se roztok S.

Choliniumjodid. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R. Použijí se čerstvě připravené roztoky.*

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí v 5 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 4 mg *choliniumjodidu CRL* se rozpustí v 5 *vody R a zředí* se *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 40 mg *suxamethoniumjodidu CRL* a 40 mg *choliniumjodidu CRL* se rozpustí v 5 *vody R a zředí* se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se po dráze 15 cm horní vrstvou mobilní fáze připravené takto: objemové díly *kyseliny mravenčí bezvodé R, vody R* a *1-butanolu R* (10 + 40 + 50) se 10 min protřepávají a potom se směs nechá stát do oddělení vrstev. Vrstva se vysuší na vzduchu a postříká se *jodobismutitanem draselným RS* a ihned se pozoruje v denním světle; objeví se červené skvrny na žlutém pozadí.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající skvrně choliniumjodidu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Amonium. 0,2 g se v 25ml kuželové baňce se zábrusem rozpustí v 5 ml *vody prosté amonia R*, přidá se 5 ml roztoku *uhličitanu sodného RS* prostého amonia. Do hrdla baňky se vsadí dobře

těsnící dutá zátka z polymeru na obou koncích otevřená. Do horní rozšířené části se vloží dva těsně zapadající kroužky z polymeru s otvorem o průměru 8 mm až 9 mm. Mezi kroužky se vloží proužek zvlhčeného *papíru lakmusového červeného R* a baňka se zahřívá ponořením do vodní lázně tak, aby hladina tekutiny v baňce byla na úrovni hladiny vodní lázně; do 5 min po ponoření baňky do vodní lázně se lakmusový papír nezbarví modře.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2 %; stanoví se s 0,300 g zkoušené látky.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %; suší se 1,000 g v sušárně při 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 1,25 m.j. v miligramu.

Stanovení obsahu

0,2000 g se rozpustí za míchání v 1 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R* a přidá se 8,0 ml *octanu rtuťnatého RS.* Vzniklá sraženina se mícháním prakticky rozpustí, přidá se 25 ml *kyseliny octové bezvodé R* a zvolna se titruje *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence za použití wolframové elektrody a uhlíkové elektrody. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,1 mg $C_{14}H_{30}I_2N_2O_4$.

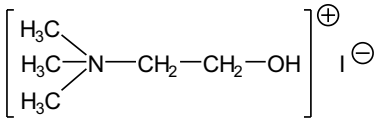
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty



A. choliniumjodid.

2724

Talcum

Mastek

$Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ M_r 379,27 CAS 14807-96-6

Je to práškovaný vybraný přírodní hydratovaný křemičitan hořečnatý. Může obsahovat proměnlivá množství hliníku a železa ve formě nerozpustné v *kyselině sírové zředěné RS*. Má být prostý mikroskopických azbestových vláken.

Vlastnosti

Lehký homogenní bílý nebo téměř bílý prášek, mastný na dotek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a ve zředěných roztocích kyselin a alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

A. Pod mikroskopem se jeví jako nepravidelné destičky, z nichž většina má délku menší než 50 μm. Částice se významně nebarví roztokem *modři methylenové R* (1 g/l) v *lihu 96% R*.

B. V kovovém kelímku se taví směs obsahující 0,5 g zkoušené látky, 1 g *dusičnanu draselného R* a 3,0 g *uhličitanu sodného bezvodého R*. Přidá se 20 ml vroucí *vody R*, promíchá se a zfiltruje se. Zbytek na filtru se promyje 50 ml *vody R*. Ke zbytku se přidá směs 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 5 ml *vody R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 17,5% RS* a 1 ml *chloridu amonného RS* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *hydrogenfosforečnanu sodného RS;* vznikne bílá krystalická sraženina.

C. 0,1 g vyhovuje zkoušce na křemičitany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 0,250 g se suspenduje ve 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. 15 min se třepe, přidá se 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Kvantitativně se přefiltruje přes papírový filtr promytý kyselinou chlorovodíkovou a kyselinou flourovodíkovou. Nerozpuštěný zbytek se uchová pro přípravu roztoku S2.

Roztok S2. Zbytek získaný při přípravě roztoku S1 se promyje 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a pak *vodou R*, dokud filtrát nedává negativní reakci na chloridy. Filtr s nerozpuštěným zbytkem se umístí do platinového kelímku a žíhá se do tmavočerveného zbarvení, dokud zcela nezmizí stopy uhlíku. Přidá se 2,5 ml *kyseliny sírové R*. Zahřívá se, dokud se neodkouří bílý dým oxidu sírového a nechá se zchladnout. Opatrně se přidá 5 ml až 10 ml *kyseliny fluorovodíkové R*. Odpařuje se bez varu, dokud nezmizí dýmy kyseliny fluorovodíkové a neobjeví se bílé dýmy oxidu sírového, a nechá se zcela vychladnout. Opatrně se přidá 20 ml *vody R* a zamíchá se. Přidá se 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Jestliže roztok opalizuje nebo je zakalený, nechá se stát, dokud se nevyčeří.

Uhličitany. Během přípravy roztoku S1 přídavek *kyseliny sírové zředěné RS* nezpůsobí žádné šumění.

Chloridy. 0,7 g se suspenduje v 10 ml *vody R*, přidá se 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS,* třepe se 15 min a zfiltruje se. 10 ml filtrátu zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (140 μg/g).

Vápník. Nejvýše 0,6 % Ca rozpustného v *kyselině sírové zředěné RS* (stanoví se za použití roztoku (a)) a nejvýše 500 μg/g Ca nerozpustného v *kyselině sírové zředěné RS* (stanoví se za použití roztoku (b)); stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok (a). K 20,0 ml roztoku S1 se přidá 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (b). K 20,0 ml roztoku S2 se přidá 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Ke vhodným objemům základního *roztoku vápníku (10 μg Ca/ml)* se přidá 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a 8 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Měří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, přenosového pásma nejlépe 1 nm a plamene oxid dusný-acetylen nebo vzduch-acetylen.

Železo rozpustné v *kyselině sírové zředěné RS*. Nejvýše 250 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se roztok S1.
Porovnávací roztoky. Ke vhodným objemům základního *roztoku železa (10 μg Fe/ml)* se přidá 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a 40 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a zředí se *vo-dou R* na 100,0 ml.

Měří se absorbance při 248,3 nm za použití železné lampy s dutou katodou jako zdroje záření, přenosového pásma nejlépe 0,2 nm a plamene vzduch-acetylen.

Hořčík rozpustný v *kyselině sírové zředěné RS*. Nejvýše 0,4 %; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. K 5,0 ml roztoku S1 se přidá 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Ke vhodným objemům základního *roztoku hořčíku (10 μg Mg/ml)* se přidá 10 ml roztoku *chloridu draselného R* (10 g/l) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Měří se absorbance při 285,2 nm za použití hořčíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, přenosového pásma nejlépe 1 nm a plamene vzduch-acetylen ve stechiometrických poměrech.

Organické látky. Zbytek získaný ve zkoušce Ztráta sušením je nanejvýše slabě žlutý nebo šedivý.

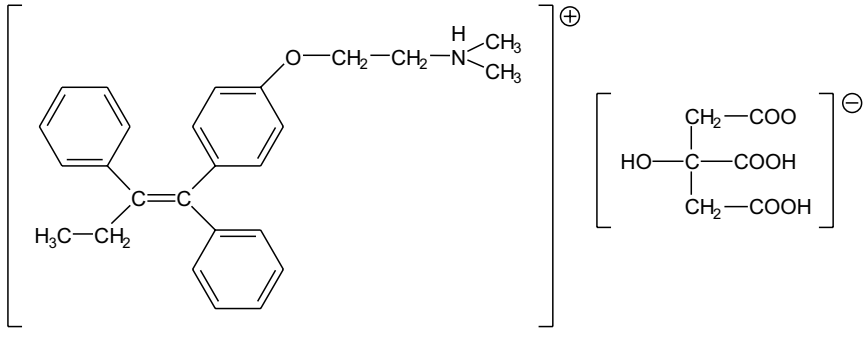
Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se zahřívá 1 h při 180 °C.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12*). Nejvýše 10^3 živých mikroorganismů v gramu; stanoví se plotnovou metodou.

† Tamoxifeni dihydrogenocitras

Tamoxifeniumdihydrogencitrat

Synonyma. Tamoxifeni citras, Tamoxifenium dihydrogencitricum



$C_{32}H_{37}NO_8$ M_r 563,65 CAS 54965-24-1

Je to (*Z*)-N-{2-[4-(1,2-difenyl-1-butenyl)fenoxy]ethyl}-N,N-dimethylamoniumdihydrogencitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{32}H_{37}NO_8$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a těžce rozpustný v acetonu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 237 nm a 275 nm. Poměr absorbance změřené v maximu při 237 nm k absorbanci měřené v maximu při 275 nm je 1,45 až 1,65.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tamoxifeniumdihydrogencitratu CRL*. Pokud se získaná spektra v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka a referenční látka v *acetonu R*, odpaří se do sucha a se zbytky se změří nová spektra.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *tamoxifeniumdihydrogencitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *tamoxifeniumdihydrogencitratu CRL* a 10 mg *klomifeniumdihydrogencitratu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *triethylaminu R* a *toluenu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší volně na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

D. Asi 10 mg se protřepáním rozpustí ve 4 ml *pyridinu R* a přidají se 2 ml *acetanhydridu R;* vznikne žluté zbarvení. Roztok se zahřívá 2 min na vodní lázni; vznikne růžové až červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

***E*-izomer a příbuzné látky.** Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*). *Roztoky se připraví za chránění před světlem těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 15,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 15,0 mg *tamoxifeniumdihydrogencitratu pro test způsobilosti CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, kterou je směs 40 objemových dílů *acetonitrilu R* a 60 objemových dílů *vody R* obsahující *dihydrogenfosforečnan sodný R* (0,9 g/l) a N,N-*dimethyloktylamin R* (4,8 g/l); upraví se pH na hodnotu 3,0 *kyselinou fosforečnou R.* Průtoková rychlost je 1,2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 240 nm.

Kolona se ustaluje promýváním mobilní fází o průtoku 1,2 ml/min po dobu asi 30 min. Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (a) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška píku *E*-izomeru na chromatogramu nebyla menší než 40 % stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže získaný chromatogram odpovídá dodanému chromatogramu s *tamoxifeniumdihydrogencitratem pro test způsobilosti CRL* v tom, že rozlišení mezi píkem odpovídajícím *E*-izomeru a píkem odpovídajícím tamoxifenu nečistotě F není menší než 3,0 a pík odpovídající tamoxifenu nečistotě F je oddělen od následujícího píku hlavní složky až na základní linii.

Nastříkne se 10 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající dvojnásobku retenčního času tamoxifenu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než 0,3násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,3 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku a píku *E*-izomeru, není větší než 0,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům s retenčním časem kratším než 2,5 min a k žádnému píku s plochou menší než 0,05násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h ve vakuu při 65 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 75 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 56,36 mg $C_{32}H_{37}NO_8$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Nečistoty

A. (*E*)-2-[4-(1,2-difenyl-1-butenyl)fenoxy]ethyldimethylamin,
B. 2-[4-(1-hydroxy-1,2-difenylbutyl)fenoxy]ethyldimethylamin,
C. 2-[4-(1,2-difenylvinyl)fenoxy]ethyldimethylamin,
D. 2-[4-(1,2-difenyl-1-propenyl)fenoxy]ethyldimethylamin,
E. 2-[2-(1,2-difenyl-1-butenyl)fenoxy]ethyldimethylamin,
F. (*Z*)-2-[4-(1,2-difenyl-1-butenyl)fenoxy]ethylmethylamin,
G. 1-(4-dimethylaminoethoxyfenyl)-2-fenylbutan-1-on.

Tanninum

Tanin

N

CAS 1401-55-4

Je to směs esterů kyseliny gallové a kyseliny galloylgallové s glukosou.

Vlastnosti

Nažloutle bílý až slabě nahnědlý amorfní prášek nebo lesklé lístky. Na vzduchu a světle tmavne. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, v acetonu a v glycerolu, prakticky nerozpustný v etheru a v etheru petrolejovém.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 5 ml a přidá se 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne modročerné zbarvení. Pak se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS;* zbarvení se změní na světle zelené.

B. 0,1 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5 ml a přidá se 0,3 ml *hydroxidu barnatého RS;* vznikne modrozelená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*.

Zásaditě reagující látky. 2 ml roztoku S se smíchají se 2 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *červeně methylové RS;* zbarvení roztoku zůstává červené.

Dextrin, gumy, sacharidy, soli. 2 ml roztoku S se zředí 2 ml *lihu 96% R;* roztok je čirý. Pak se přidá 1 ml *etheru R;* do 10 min se roztok nezakalí.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10 %. 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Poznámka: Roztoky taninu se připravují vždy čerstvé.

Taraxaci radix cum herba

N

Smetankový kořen s natí

Synonymum. Radix cum herba taraxaci

Je to usušený kořen, list a nerozvitý úbor druhu *Taraxacum officinale agg.*

Vlastnosti

Droga slabého pachu, hořké chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Kořen kůlový, podélně hrubě brázditý, 10 cm až 15 cm dlouhý, o průměru až 1,5 cm; na povrchu šedohnědý až černohnědý, tvrdý, křehký. Lom hladký. Na lomu patrna široká, bělavá kůra s četnými hnědě zbarvenými mléčnicemi a citronově žluté dřevo, které nemá paprsčitou strukturu. Kořenová hlava krátká, příčně proužkovaná, často mnohohlavá. Listy v bohaté přízemní růžici, v obrysu obvejčité až obvejčitě kopinaté, lysé nebo jen na spodní straně slabě chlupaté, nedělené, většinou však až kracovitě peřenodílné. Úkrojky listu trojúhlé, většinou zubaté; řapík křídlatý, většinou zubatý. Na spodní straně listu mohutná bělavá až fialově nahnědlá hlavní žilka. Úbory jednotlivé, na dutých, bezlistých stoncích. Vnější listeny zákrovu čárkovitě kopinaté, tmavozelené, někdy sivozelené, nevýrazně úzce bledě lemované. Zákrov dvouřadý, vnější listeny kratší a širší než vnitřní; pod špičkou nejvýš slabě mozolkaté. Lůžko bez plevek. Květy dlouhé, úzké, žluté, většinou hnědavě proužkované. Nažky slámově žluté až hnědé, bradavčité až osténkaté s kuželovým násadcem nesoucím tenký zobánek s měkkým, víceřadým chmýrem, ze štětinek jednoduchých, drsných.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky korku a obliterované tkáně primární kůry; okrouhle mnohohranné buňky parenchymu primární kůry s hrudkami inulinu; sítkovice jednotlivě nebo ve skupinách, provázené mléčnicemi s hnědým zrnitým obsahem; úlomky anastomozujících mléčnic; síťovitě ztlustlé cévy o průměru 15 μm až 60 μm provázené náhradními vlákny. Úlomky pokožky listu z buněk se stěnami vlnitě zprohýbanými a s anomocytickými průduchy (*2.8.3*); mnohobuněčné, jednořadé krycí chlupy až 200 μm dlouhé, často kolabované nebo jejich úlomky; krycí chlupy s dvouřadou bází, ze čtyř až šesti buněk s hnědými stěnami a jednou terminální buňkou; kruhovitě ztlustlé cévy provázené hnědými, anastomozujícími mléčnicemi; pylová zrna kulovitá o průměru 30 μm až 40 μm, s jemně ostnitou exinou a třemi klíčními póry.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 4 % a nejvýše 8 % zhnědlé drogy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 11,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

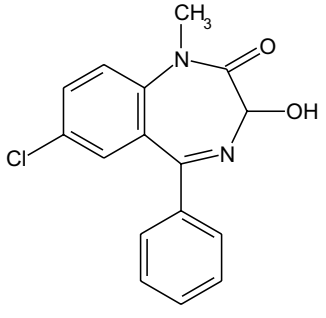
Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

§ Temazepamum

Temazepam



$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$ M_r 300,74 CAS 846-50-4

Je to (*RS*)-7-chlor-5-fenyl-2,3-dihydro-3-hydroxy-1-methyl-1*H*-1,4-benzo-diazepin-2-on. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{13}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 157 °C až 160 °C.

B. *Roztoky se připravují těsně před použitím, zkouška se provádí za chránění před světlem.* 40,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 50,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 230 nm a prodlevu při asi 250 nm a může vykazovat široké

absorpční maximum při asi 315 nm a menší inflexi při 275 nm. Specifická absorbance v maximu při 230 nm je 1040 až 1140.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *temazepamu CRL.*

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *temazepamu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *temazepamu CRL* a 10 mg *flunitrazepamu CRL* se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *etheru R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. *Roztoky se připravují těsně před použitím, zkouška se provádí za chránění před světlem.* Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 2 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (2 + 98) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

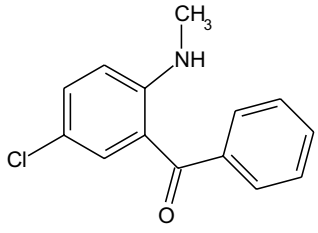
0,250 g se rozpustí v 50 ml *nitroethanu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,07 mg $C_{16}H_{13}ClN_2O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Psychotropní látka.

Nečistoty

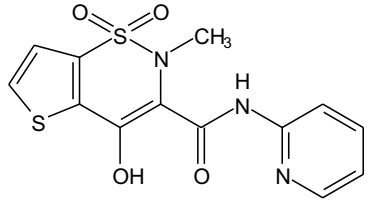


A. 5-chlor-2-methylaminobenzofenon.

† Tenoxicamum

1998

Tenoxikam



$C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$ M_r 337,37 CAS 59804-37-4

Je to 4-hydroxy-2-methyl-3-[N-(2-pyridyl)karboxamido]-2*H*-thieno[2,3-*e*]1,2-thiazin-1,1-dioxid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v dichlormethanu, velmi těžce rozpustný v ethanolu. Rozpouští se v roztocích kyselin a zásad.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *tenoxikamu CRL.* Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka i referenční látka v minimálním množství *dichlormethanu R*, odpaří se do sucha na vodní lázni a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,10 g se rozpustí ve 20 ml *dichlormethanu R;* roztok je čirý (*2.2.1*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G-F_{254} R.*

Zkoušený roztok. 0,4 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (4 + 96) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (4 + 96) na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *tenoxikamu CRL* a 20 mg *kyseliny salicylové CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (4 + 96) a zředí se stejnou směsí na 5 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *2-pyridylaminu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (4 + 96) a zředí se stejnou směsí na 5 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, methanolu R, acetonu R* a *dichlormethanu R* (5 + 5 + 20 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající 2-pyridylaminu není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající 2-pyridylaminu, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,25 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

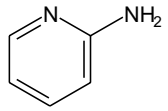
0,250 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 70 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 33,74 mg $C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$.

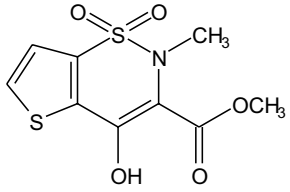
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



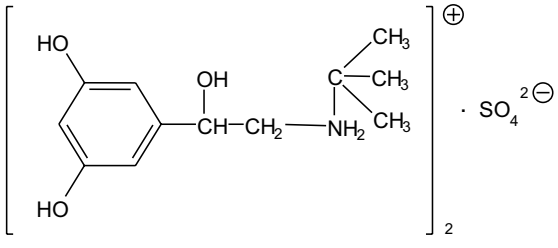
A. 2-pyridylamin,



B. 1,1-dioxid methyl-4-hydroxy-2-methyl-2*H*-thieno[2,3-*e*]1,2-thiazin-3-karboxylatu.

† Terbutalini sulfas

Terbutaliniumsulfat



$C_{24}H_{40}N_2O_{10}S$ M_r 548,65 CAS 23031-32-5

Je to bis[(*RS*)-N-terc.butyl-2-hydroxy-2-(3,5-dihydroxyfenyl)ethylamonium]sulfat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{24}H_{40}N_2O_{10}S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 70,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 276 nm a 280 nm, která mohou být spojena bez výrazného minima. Specifická absorbance v obou maximech je 65 až 70.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *terbutaliniumsulfatu CRL*. Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka i referenční látka v *methanolu prostém aldehydu R*, odpaří se do sucha, ze zbytku se připraví nové tablety nebo suspenze a zaznamenají se nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*). Absorbance roztoku S (*2.2.25*) měřená při 400 nm v 2cm kyvetě je nejvýše 0,11.

Kysele reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 1,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R;* vrstva se před použitím promyje mobilní fází.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *terbutaliniumsulfatu CRL* se rozpustí v 0,5 ml *vody R* a zředí se *lihem 96% R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *methanolu prostého aldehydu R* (1,5 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (10 g/l). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

2-(Terc.butylamino)-1-(3,5-dihydroxyfenyl)ethanon. 0,20 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) měřená při 330 nm je nejvýše 0,50.

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,8 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (25 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

0,300 g se zahřátím rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 54,86 mg $C_{24}H_{40}N_2O_{10}S$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.
Separandum.

Terebinthinae etheroleum rectificatum

N

Čištěná terpentýnová silice

Synonyma. Terebinthinae aetheroleum rectificatum, Oleum terebinthinae rectificatum

Je to čištěná silice získaná z balzámu různých druhů rodu *Pinus* destilací s vodní parou. Obsahuje nejméně 95,0 % pinenů ($C_{10}H_{16}$; M_r 136,24), počítáno jako α-pinen a ß-pinen.

Vlastnosti

Bezbarvá čirá kapalina charakteristického pachu. Je velmi těžce rozpustná ve vodě, mísitelná s ethanolem, s etherem a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 30 μl se rozpustí v 1 ml *toluenu R.*
Porovnávací roztok. 40 μl *bornylacetatu R* a 5 mg *borneolu R* se rozpustí v *toluenu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku a vyvíjí se dvakrát *dichlormethanem R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Skvrna odpovídající bornylacetatu na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšuje velikostí a intenzitou skvrnu bornylacetatu na chromatogramu porovnávacího roztoku; skvrna odpovídající borneolu není na chromatogramu zkoušeného roztoku přítomna. V dolní polovině chromatogramu zkoušeného roztoku jsou tři až čtyři intenzivně modrofialové skvrny, ve střední části je patrna růžově červená skvrna, intenzita zbarvení této skvrny je závislá na stáří silice; v blízkosti čela chromatogramu je patrná intenzivně fialová skvrna.

Zkoušky na čistotu

Hustota *(2.2.5)*. 0,855 až 0,866 g/ml.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,467 až 1,477.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 1,0; 5,0 g se rozpustí v předepsané směsi rozpouštědel.

Voda v silicích *(2.8.5)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Voda v silicích.

Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice *(2.8.7)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice.

Pach a chuť silic *(2.8.8)*. Vyhovuje požadavkům zkoušky Pach a chuť silic.

Zbytek po odpaření silic *(2.8.9)*. Nejvýše 0,5 % (0,01 g); stanoví se s 2,0 g zkoušené látky.

Rozpustnost v lihu *(2.8.10)*. Je rozpustná v šesti objemových dílech *lihu 96% (V/V).*

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie *(2.2.28)*.

Roztok vnitřního standardu. 0,250 g *undekanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Zkoušený roztok. 0,250 g se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml se smíchají se 2,0 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 125,0 mg *α-pinenu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 25,0 ml. 2,0 ml se smíchají se 2,0 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární kolony délky 60 m, vnitřního průměru 0,53 mm a vnitřní stěnou pokrytou vrstvou *poly-[fenyl(5)methyl(95)]siloxanu R;* tloušťka vrstvy je 1,5 μm,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 1,5 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- programované teploty; teplota kolony se zvyšuje ze 60 °C rychlostí 3 °C/min až na 135 °C,
- teploty nástřikového prostoru a detektoru 220 °C.

Nastříkne se odděleně po 0,5 μl zkoušeného a porovnávacího roztoku. Nástřiky se opakují nejméně třikrát. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy: α-pinenu asi 13 min, ß-pinenu asi 15 min a undekanu asi 21 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže symetrie píku je nejméně 0,8 a nejvýše 1,2, počítáno pro pík α-pinenu, a je-li rozlišení dvou po sobě následujících píků nejméně 1,5.

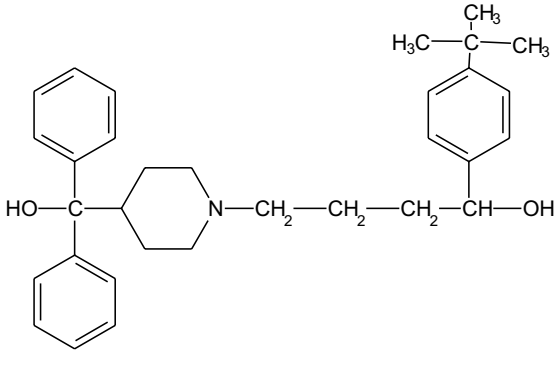
Obsah pinenů v procentech se vypočítá metodou vnitřního standardu.

Uchovávání

Ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.

Terfenadinum

Terfenadin



$C_{32}H_{41}NO_2$ M_r 471,68 CAS 50679-08-8

Je to (*RS*)-1-(4-terc.butylfenyl)-4-{4-[hydroxy(difenyl)methyl]piperidino}-1-butanol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{32}H_{41}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v kyselině chlorovodíkové zředěné, snadno rozpustný v dichlormethanu, dobře rozpustný v methanolu.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 146 °C až 152 °C.

B. 50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 259 nm a prodlevy při 253 nm a 270 nm. Specifická absorbance v maximu je 13,5 až 14,9.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *terfenadinu CRL.*

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 50 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50 mg *terfenadinu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 15 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 20,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 15 mg *terfenadinu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 5,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí mobilní fází na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,1 g *jodidu draselného R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí připravenou takto: 600 ml *acetonitrilu R* se zředí *tlumivým roztokem diethylamoniumfosforečnanovým o pH 6* na 100 ml. Průtoková rychlost je 1 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 217 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se po 20 μl každého roztoku a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 5násobku retenčního času terfenadinu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je rozlišení mezi píkem terfenadinu a píkem terfenadinu nečistoty A nejméně 5,0 a kapacitní poměr píku terfenadinu je větší než 2,0. Kapacitní poměr se stanoví za použití *jodidu draselného R* jako nezadržované složky. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 2,5 % plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší při 60 °C pod tlakem nepřevyšujícím 0,5 kPa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 47,17 mg $C_{32}H_{41}NO_2$.

Uchovávání

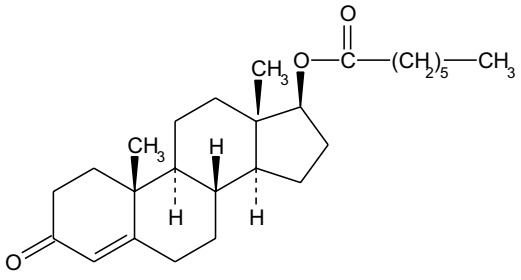
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

A. 1-(4-terc.butylfenyl)-4-[4-hydroxydifenylmethyl)piperidin-1-yl]-1-butanon,
B. 1-(4-terc.butylfenyl)-4-[4-difenylmethyl)piperidin-1-yl]-1-butanol,
C. N-oxid 1-(4-terc.butylfenyl)-4-[4-(hydroxydifenylmethyl)piperidin-1-yl]-1-butanolu,
D. 1-(4-terc.butylfenyl)-4-[4-(difenylmethylen)piperidin-1-yl]-1-butanol,
E. kyselina 1-[4-(4-terc.butylfenyl)-4-hydroxybutyl]piperidin-4-karboxylová,
F. 1-[4-(4-terc.butylfenyl)-3-butenyl]-4-difenylmethylenpiperidin,
G. {1-[4-(4-terc.butylfenyl)-3-butenyl]piperidin-4-yl}-(difenyl)methanol,
H. {1-[4-(4-terc.butylfenyl)butyl]piperidin-4-yl}(difenyl)methanol,
I. difenyl(piperidin-4-yl)methanol,
J. ethyl-1-[4-(4-terc.butylfenyl)-4-hydroxybutyl]piperidin-4-karboxylat.

† Testosteroni enantas

Testosteronenantat



$C_{26}H_{40}O_3$ M_r 400,60 CAS 315-37-7

Je to 3-oxo-4-androsten-17β-yl-heptanoat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{26}H_{40}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v ethanolu a v etheru, je dobře rozpustný v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 34 °C až 39 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *testosteronenantatu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu oktadecylsilanisovaného pro chromatografii s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *testosteronenantatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *testosteronenatatu CRL*, 5 mg *testosterondekanoatu CRL* a 5 mg *testorenisokapronatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *acetonitrilu R* a *2-propanolu R* (20 + 40 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a zahřívá se 10 min při 100 °C. Po vychladnutí se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Pak se vrstva postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se v sušárně 10 min při 120 °C. Po vychladnutí se vrstva pozoruje

v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku je zelená a shoduje se polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně oddělené hlavní skvrny, a to při obou uvedených způsobech detekce.

D. K asi 25 mg se přidají 2 ml *hydroxidu sodného R* (10 g/l) v *methanolu R* a vaří se 1 h pod zpětným chladičem. Pak se ochladí, přidá se 10 ml *vody R* a roztok se okyseluje *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS,* dokud *papír lakmusový modrý R* není červený. Zfiltruje se, sraženina se promyje malým množstvím *vody R* a 3 h se suší při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa. Teplota tání (*2.2.14*) vysušené sraženiny je 150 °C až 153 °C.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*) +77° až +82°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 20 mg *testosteronpropionatu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 9), přidá se 1 ml zkoušeného roztoku a zředí se stejnou směsí na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *ethylacetatu R* a *toluenu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, pak se postříká *kyselinou sírovou v lihu RS* a zahřívá se 10 min při 120 °C.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně oddělené hlavní skvrny.

Testosteronkapronat. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *testosteronkapronatu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 20,0 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,12 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min, která je směsí objemových dílů *vody R* a *acetonitrilu R* (30 + 70),
- spektrofotometrického detektoru, 240 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výšky obou píků na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyly menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na získaném chromatogramu má pík odpovídající testosteronkapronatu relativní retenční čas vzhledem k druhému píku odpovídajícímu testosteronenantatu hodnotu asi 0,7.

Postupně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího testosteronkapronatu není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Kyselina heptanová. 0,50 g se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R* předem zneutralizovaného na *modř bromthymolovou RS3*. Ihned se titruje *hydroxidem sodným 0,01 mol/l VS*. Ke změně zbarvení indikátoru do modra se spotřebuje nejvýše 0,6 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS* (0,16 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml.

Měří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 241 nm.

Vypočítá se obsah $C_{26}H_{40}O_3$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 422.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Separandum.

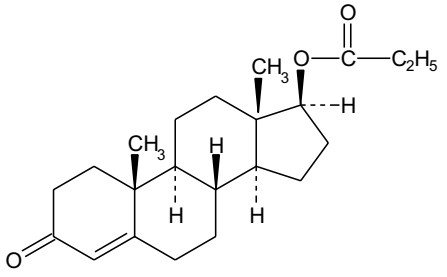
Nečistoty

A. kyselina heptanová,
B. 3-oxo-4-androsten-17β-yl-hexanoat (testosteronkapronat),
C. 3-oxo-5α-androstan-17β-yl-heptanoat,
D. 17β-hydroxy-4-androsten-3-on (testosteron).

† Testosteroni propionas

Testosteronpropionat

Synonymum. Testosteronum propionicum



$C_{22}H_{32}O_3$ M_r 344,49 CAS 57-85-2

Je to 3-oxo-4-androsten-17β-yl-propionat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{22}H_{32}O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v lihu 96% a v methanolu a je dobře rozpustný v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 119 °C až 123 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *testosteronpropionatu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogram zkoušeného roztoku (b) a hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (c) se shodují polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Vrstva se pak postříká *kyselinou sírovou v lihu 96% RS,* zahřívá se 15 min při 120 °C a nechá se ochladit. Vrstva se pozoruje v denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (c) se shodují polohou, barvou v denním světle, fluorescencí v ultrafialovém světle při 365 nm a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího porovnávacího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) a chromatogramu porovnávacího roztoku (b) mají hodnotu R_F zřetelně nižší než hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (c) a chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +83° až +90°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). V 25ml odměrné baňce se rozpustí 50 mg v 6 ml *methanolu R*. Přidají se 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS,* do hrdla odměrné baňky se vloží malá nálevka jako kondenzor a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Pak se ochladí pod tekoucí vodou, přidají se 2,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.
Zkoušený roztok (c). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 10,0 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *chloroformem R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). V 25ml odměrné baňce se rozpustí 50 mg *testosteronpropionatu CRL* v 6 ml *methanolu R*. Přidají se 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS,* do hrdla odměrné baňky se vloží malá nálevka jako kondenzor a zahřívá se 5 min na vodní lázni. Pak se ochladí pod tekoucí vodou, přidají se 2,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 20 mg *testosteronpropionatu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *testosteronacetatu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (e). K 5,0 ml porovnávacího roztoku (d) se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *chloroformem R* na 15,0 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl zkoušených roztoků (b), (c) a porovnávacích roztoků (b) a (c) a po 2 μl zkoušeného roztoku (a) a porovnávacích roztoků (a), (d) a (e) a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *etheru petrolejového R* a *butylacetatu R* (1 + 30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídající skvrně testosteronacetatu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (2,0 %) a žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající testosteronacetatu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

25,0 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 250,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 241 nm.

Vypočítá se obsah $C_{22}H_{32}O_3$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 490.

Uchovávání

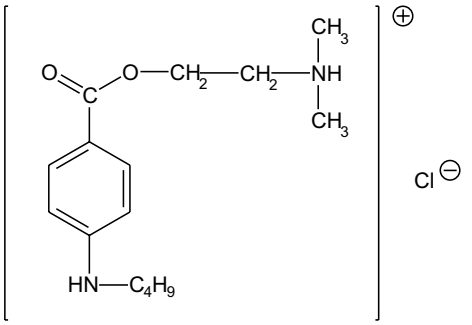
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Tetracaini hydrochloridum

Tetrakainiumchlorid

Synonymum. Tetracainium chloratum



$C_{15}H_{25}ClN_2O_2$ M_r 300,83 CAS 136-47-0

Je to [2-(4-butylaminobenzoyloxy)ethyl]dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{25}ClN_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický slabě hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 148 °C nebo v případě dalších dvou krystalických forem při asi 134 °C a 139 °C. Směsi těchto forem tají při 134 °C až 147 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *tetrakainium-chloridu CRL.*

B. K 10,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *thiokyanatanu amonného RS*. Vzniká bílá krystalická sraženina, která se rekrystalizuje z *vody R* a suší se 2 h při 80 °C; teplota tání (*2.2.14*) je asi 131 °C.

C. K asi 5 mg se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R*. Odpaří se do sucha na vodní lázni, nechá se ochladit, zbytek se rozpustí v 5,0 ml *acetonu R* a přidá se 0,2 ml *hydroxidu draselného v lihu RS;* vzniká fialové zbarvení.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. 2 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 6,5; měří se roztok připravený zředěním 1 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G-F_{254} R*. Vrstva se předběžně vyvíjí směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *hexanu R* a *dibutyletheru R* (4 + 16 + 80) po dráze 12 cm, pak se vyjme a několik minut se suší v proudu teplého vzduchu. Vrstva se před použitím nechá ochladit.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 50,0 mg *kyseliny 4-aminobenzoové R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *hexanu R* a *dibutyletheru R* (4 + 16 + 80) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 10 min při 100 °C až 105 °C a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,05 %). Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku zůstává na startu.

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve směsi obsahující 5 ml *acetanhydridu R* a 25 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Roztok se 2 min zahřívá pod zpětným chladičem a pak se přidá 6 ml *octanu rtuťnatého RS*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,05 ml *violeti krystalové RS* jako indikátoru.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,08 mg $C_{15}H_{25}ClN_2O_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Tetracosactidum

Tetrakosaktid

Ser—Tyr—Ser—Met—Glu—His—Phe—Arg—Trp—Gly—Lys—Pro—

Val—Gly—Lys—Lys—Arg—Arg—Pro—Val—Lys—Val—Tyr—Pro

$C_{136}H_{210}N_{40}O_{31}S$ M_r 2933,46 CAS 16960-16-0

Je to syntetický polypeptid, který má stejné pořadí aminokyselin, jako prvních 24 aminokyselin v molekule lidského kortikotropinu. Vyrábí se jako octan a obsahuje vodu. Zvyšuje vylučování kortikoidních hormonů nadledvin. Počítáno na bezvodou a kyseliny octové prostou látku, účinnost je nejméně 800 m.j. v miligramu.

Vlastnosti

Bílý nebo žlutý amorfní prášek. Je mírně rozpustný ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. V podmínkách popsaných ve Stanovení obsahu zvyšuje zkoušená látka množství kortikosteronu vytvářeného izolovanými buňkami nadledvin potkanů.

B. Provede se elektroforéza (*2.2.31*) a tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) k dosažení dvojrozměrného rozdělení. Použijí se dvě desky s vrstvou *celulosy pro chromatografii R1*.

Zkoušený roztok. 1 mg se rozpustí v 0,2 ml roztoku *octanu amonného R* (15,4 g/l), jehož pH se upraví *amoniakem zředěným RS2* na 8,2. Potom se přidá 10 μl roztoku *trypsinu R* (2 g/l). Směs se 40 min inkubuje při 37 °C až 38 °C a pak se 3 min vaří ve vodní lázni. Nakonec se přidá 5 μl *kyseliny octové ledové R* a odpaří se do sucha při 40 °C a tlaku, který nepřesáhne 3 kPa. Skelný odparek se suší 1 h při 40 °C a pak se rozpustí v 0,1 ml *kyseliny octové ledové R*. Roztok se lyofilizuje, zbytek se rozpustí v 0,1 ml *vody R* a znovu se lyofilizuje. Konečný zbytek se 1 h suší při 45 °C a tlaku, který nepřesáhne 3 kPa, a pak se rozpustí v 50 μl *vody R*.

Porovnávací roztok. Připraví se současně a stejným způsobem jako zkoušený roztok; místo zkoušené látky se však použije *tetrakosaktid CRL*.

Vrstvy se postříkají roztokem elektrolytu, který obsahuje 0,2 % (*V/V*) *kyseliny octové ledové R* a 0,2 % (*V/V*) *pyridinu R*. Pomocí filtračních pásků 1,5 cm širokých se spojí konce vrstev s příslušnou komůrkou každého chromatografického žlábku. Celá nádoba se uzavře a nechá 30 min stát. Pak se nanesou roztoky na anodovou stranu. Na první vrstvu se do rohu asi 2,5 cm od každé strany nanesou 4 μl zkoušeného roztoku. Na druhou vrstvu se ve stejném místě nanesou 4 μl porovnávacího roztoku. Obě vrstvy se vyvíjejí 90 min při napětí 280 V na 200 mm délky. Pak se suší 30 min na vzduchu a následovně 30 min v proudu vzduchu při 30 °C. Potom se na každé vrstvě provede druhé dělení chromatograficky. Vyvíjí se s pravém úhlu ke směru elektroforézy směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *pyridinu R*, *vody R* a *1-butanolu R* (8 + 24 + 30 + 38) po dráze 15 cm. Vrstvy se usuší v proudu vzduchu a postříkají *ninhydrinem RS1*. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Intenzity obou skvrn se mohou lišit.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -99° až -109°, počítáno na bezvodou látku prostou kyseliny octové. Měří se roztok připravený rozpuštěním 10,0 mg v 1,0 ml směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* (1 + 99).

Absorbance (*2.2.25*). 1,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 5,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 240 nm až 280 nm. Absorpční maximum je při 276 nm. Absorbance v maximu je 0,51 až 0,61, počítáno na bezvodou látku prostou kyseliny octové. Poměr absorbance naměřené v maximu při 276 nm k absorbanci při 248 nm je 2,4 až 2,9.

Aminokyseliny. Stanoví se pomocí aminokyselinového analyzátoru s použitím *norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se kalibruje směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku a následujících aminokyselin:

lysin	serin	methionin
histidin	kyselina glutamová	isoleucin
arginin	prolin	leucin
kyselina asparagová	alanin	tyrosin
threonin	valin	fenylalanin

spolu s polovinou ekvimolárního množství cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 30,0 mg *norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 4,6 mg zkoušené látky se převede do pečlivě vyčistěné zkumavky z tvrzeného skla délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm. Přidá se přesně změřené množství roztoku vnitřního standardu obsahující takové množství *DL-norleucinu R*, které odpovídá asi polovině očekávaného molárního množství tetrakosaktidu. Zkumavka se ponoří do mrazicí směsi -5 °C, evakuuje se na tlak, který není větší než 133 Pa, a zataví se. Pak se zahřívá 24 h při 110 °C až 115 °C. Po ochlazení se zkumavka otevře a obsah se přemístí do 10ml baňky tak, že se pětkrát přidá do zkumavky 0,2 ml *vody R* a přeleje do baňky. Roztok v baňce se za sníženého tlaku odpaří do sucha nad *hydroxidem draselným R*. Znovu se přidá ke zbytku *voda R* a odpaří se za sníženého tlaku do sucha nad *hydroxidem draselným R*. Tento postup se opakuje ještě jednou. Nakonec se zbytek rozpustí ve vhodném tlumivém roztoku o pH 2,2 a zředí se jím na vhodný objem. Do aminoanalyzátoru se použije takový přesně odměřený objem zkoušeného roztoku, aby píky aminokyselin přítomných v nejvyšších množstvích zaujímaly většinu stupnice zapisovače.

Obsah každé aminokyseliny se vyjádří v molech. Relativní poměr aminokyselin se vypočítá za předpokladu, že podíl valinu se rovná 3. Hodnoty se pak pohybují v následujících rozmezích: lysin 3,5 až 4,7, histidin 0,9 až 1,1, arginin 2,7 až 3,3, serin 1,1 až 2,2, kyselina glutamová 0,9 až 1,1, prolin 2,5 až 3,5, glycin 1,8 až 2,2, methionin 0,9 až 1,1, tyrosin 1,7 až 2,2, fenylalanin 0,9 až 1,1. V hydrolyzátu mohou být dále přítomny pouze stopy ostatních aminokyselin, kromě norleucinu.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže výsledný počet molů norleucinu přepočtený na objem zkoušeného roztoku použitého ke zkoušce je v rozmezí ±5 % množství vzatého k hydrolýze.

Příbuzné peptidy.

a) Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) za použití odplyněných rozpouštědel.

Zkoušený roztok. 1,0 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *vody R*.

Porovnávací roztok (a). 1,0 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml 1% (*V/V*) roztoku *kyseliny octové ledové R*, přidá se 50 μl směsi objemových dílů *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a *vody R* (1 + 999). Nechá se 2 h stát.

Porovnávací roztok (b). 1,0 mg *tetrakosaktidu CRL* se rozpustí v 1 ml *vody R*.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí 365 ml *acetonitrilu R*, 10,0 ml *kyseliny octové ledové R* a 10,0 g *síranu amonného R*, zředěné *vodou R* na 2000 ml. Průtoková rychlost je 2,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Nastříknou se odděleně oba roztoky a zajistí se, aby stříkačka, kterou se nastřikuje zkoušený roztok, nebyla kontaminována peroxidem. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je pík tetrakosaktidu odpovídající hlavnímu píku na chromatogramu zkoušeného roztoku a pík s menším retenčním časem odpovídající sulfoxidu tetrakosaktidu. Jeho plocha je významně větší než plocha příslušného píku na chromatogramu zkoušeného roztoku, ale není větší než 4 % součtu ploch všech píků, vyjímaje píky rozpouštědla a zkoumadel.

b) Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *celulosy pro chromatografii R*.

Zkoušený roztok. 3,0 mg zkoušené látky se rozpustí v 1,5 ml směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *vody R*.

Porovnávací roztok (a). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *vody R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové zředěné RS* a *vody R* na 10 ml.

Porovnávací roztok (c). K 0,5 ml zkoušeného roztoku se přidá 50 μl směsi objemových dílů *peroxidu vodíku koncentrovaného R* a *vody R* (1 + 999) a nechá se 2 h stát.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku do asi 1cm pruhů a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *pyridinu R*, *vody R* a *1-butanolu R* (4 + 24 + 30 + 42) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a postříká se *ninhydrinem RS1*. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je zóna odpovídající polohou základní zóně na chromatogramu zkoušeného roztoku, ale má menší intenzitu a navíc je přítomna výrazná zóna sulfoxidu tetrakosaktidu s nižším R_F. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není, kromě základní zóny, žádná zóna ani zóna sulfoxidu tetrakosidu intenzivnější než zóna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (5,0 %) a nejvýš jedna zóna může být intenzivnější než zóna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,5 %).

Peptidy. Nejméně 85,0 %, vztaženo na $C_{136}H_{210}N_{40}O_{31}S$, počítáno na bezvodou látku prostou kyseliny octové. Vyhodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce (a) na příbuzné peptidy. Obsah $C_{136}H_{210}N_{40}O_{31}S$ se vypočítá z výšek píků nebo jejich ploch na chromatogramu zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a známého množství $C_{136}H_{210}N_{40}O_{31}S$ v *tetrakosaktidu CRL*. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) není rozlišení mezi píky tetrakosaktidu a sulfoxidu tetrakosaktidu menší než 7.

Kyselina octová. 8 % až 13 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *dioxanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1 ml *dioxanu R* se zředí *vodou R* na 1000 ml.
Zkoušený roztok (a). 10,0 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml *vody R*.
Zkoušený roztok (b). 10,0 mg zkoušené látky se rozpustí v 1 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 0,100 g *kyseliny octové ledové R* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí jím na 100 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (125 μm až 180 μm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 5 % až 16 %; provede se s 80,0 mg zkoušené látky.

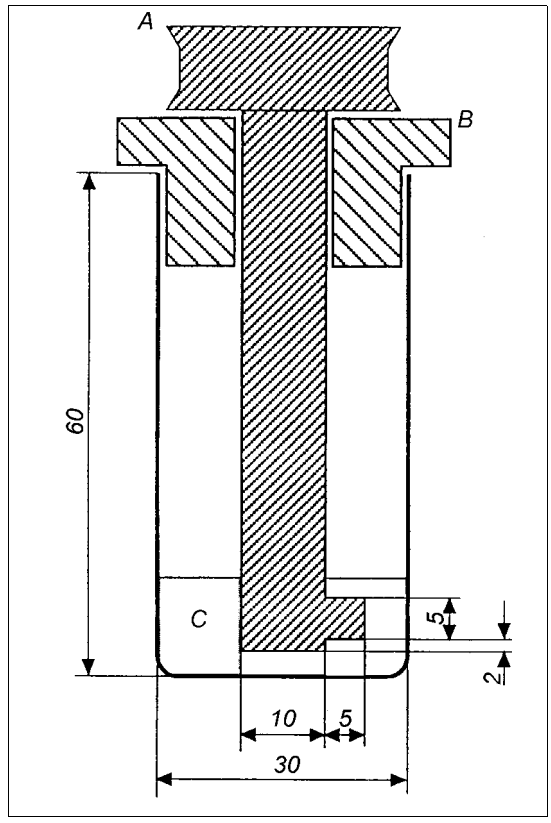
Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušené látky se stanoví za daných podmínek porovnáním její schopnosti zvyšovat množství kortikosteronu produkovaného izolovanými buňkami z nadledvin potkanů s účinností mezinárodního referenčního přípravku tetrakosaktidu nebo porovnávací látky kalibrované v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku, který se skládá ze syntetického tetrakosaktidu a manitolu. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Nalezená hodnota účinnosti je v rozmezí 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je v rozmezí 64 % až 156 % deklarované účinnosti.

Použije se silikonované sklo dobře vymyté vodou. Čtyři potkani, samci vážící 200 g až 400 g, se usmrtí vykrvácením. Vyjmou se nadledviny, opatrně se očistí od okolní tukové tkáně a vloží se do roztoku B uchovávaného při 4 °C. Každá žláza se rozkrojí na čtyři stejné díly a přenese do vhodného míchacího zařízení z plastické hmoty (viz obrázek 1), ve kterém je 5 ml roztoku C udržovaného při 37 °C. Buňky nadledvin se dispergují mícháním směsi při 500 ot/min. Po 20 min se odstraní supernatantní tekutina, ochladí se na 4 °C, přidá se 5 ml roztoku C a znovu se míchá. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Všech pět supernatantů se spojí a odstřeďuje 30 min v polyetylenových zkumavkách při 4 °C 30 min při postupném zvyšování rychlosti do 100 g_n. Sediment se suspenduje v 8 ml roztoku D a odstřeďuje se 30 min při 100 g_n. Získaný sediment se znovu suspenduje v 8 ml roztoku D, směs se filtruje přes nylonovou síťku s otvory 100 μm do polyetylenové kádinky a k filtrátu se přidá vhodný objem roztoku D (bylo zjištěno, že vhodný celkový objem filtrátu je mezi 65 ml až 105 ml). Výsledná buněčná suspenze se uchovává při 4 °C.



Obr. 1. Míchací zařízení
Rozměry v milimetrech
A - kladka a míchací lopatka,
B - ložisko,
C - inkubační roztok.

Ze zkoušeného roztoku o vhodné koncentraci a z porovnávacího roztoku se připraví s ředicím roztokem E čtyři koncentrace v geometrické řadě s dvojnásobným ředěním. 0,1 ml z každého zředění se pipetuje do čtyř polystyrenových zkumavek a do každé zkumavky se přidá 1,0 ml výše připravené buněčné suspenze. Zkumavky se inkubují 2 h při 37 °C a pak se ochladí na 4 °C. 1 ml obsahu každé zkumavky se přenese do skleněných zkumavek obsahujících 1,4 ml *dichlormethanu R*, směs se promíchá 10 s na vířivé míchačce a odstřeďuje se 5 min při 3000 g_n. 1 ml dichlormethanové vrstvy z každé zkumavky se přenese, bez porušení vodné vrstvy, do skleněných zkumavek obsahujících 0,6 ml směsi objemových dílů *lihu 96% R* a *kyseliny sírové R* (15 + 35). Směs se 10 s míchá na vířivé míchačce, odstřeďuje se 5 min při 1500 g_n a nechá se 30 min stát. Fluorimetricky (*2.2.21*) se stanoví iradiace spodní vrstvy při excitační vlnové délce 436 nm nebo 470 nm a fluorescence se měří v maximu mezi 530 nm a 545 nm. Jestliže roztoky nejsou při měření přeneseny do kyvet, je nutné vybrat zkumavky, v nichž fluorescenční hodnoty pro standard kortikosteronu se neliší mezi sebou více než o 5 %. Výsledky stanovení se počítají obvyklými statistickými metodami. Použije se lineární část logaritmické křivky odpovědi na dávce.

Roztok A

chlorid sodný R	6,60 g
chlorid draselný R	0,353 g
hydrogenuhličitan sodný R	0,840 g
dihydrogenfosforečnan draselný R	0,161 g
síran hořečnatý R	0,291 g
chlorid vápenatý R	0,373 g
kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová	4,77 g

Výše uvedené látky se rozpustí přibližně v 950 ml *vody R*, pH roztoku se upraví *hydroxidem sodným 1 mol/l RS* na 7,4, přidá se 60 mg *benzylpenicilinu sodné soli R* a takové množství *streptomyciniumsulfatu R*, které odpovídá 100 mg streptomycinu. Pak se roztok zředí *vodou R* na 1000 ml.
Roztok B. K roztoku A se přidá *glukosa R* (2 g/l).
Roztok C. K roztoku B se přidá kolagenasa získaná z *Clostridium histolyticum* a dostatečně čistá pro přípravu dispergovaných buněk (1 g/l).
Roztok D. K roztoku B se přidá *albumin hovězí R* (5 g/l).
Roztok E. Ke sterilnímu roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se přidá *albumin hovězí R* (1 g/l) a pH roztoku se upraví *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 2,0.

Uchovávání

Pod dusíkem, chráněn před světlem, při teplotě 2 C až 8 C.
Separandum.

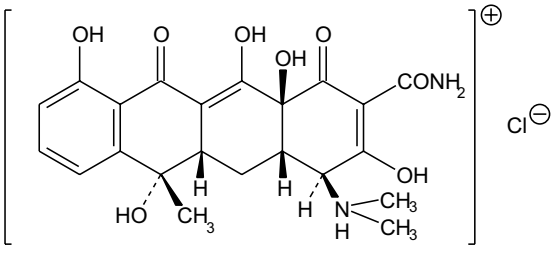
Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v mezinárodních jednotkách na miligram,
- obsah peptidu v balení,
- podmínky uchovávání.

† Tetracyclini hydrochloridum

Tetracykliniumchlorid

Synonymum. Tetracyclinium chloratum



$C_{22}H_{25}ClN_2O_8$ M_r 480,90 CAS 64-75-5

Je to (4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-(1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-2-karbamoyl-6-methyl-1,11-dioxo-4-naftacenyl)dimethylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{25}ClN_2O_8$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů. Vodné roztoky se stáním kalí vlivem vysrážení tetracyklinu.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na hodnotu 8,0, (asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm). Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL*, 5 mg *chlortetracykliniumchloridu-CRL* a 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg látky se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vzniká fialově červené zbarvení. Roztok se přidá k 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní ve žluté.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 1,8 až 2,8. Měří se následující roztok: 0,1 g se rozpustí v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -240° až -255°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se porovnávací roztok (g). Zkoušku lze hodnotit, jestliže pík odpovídající anhydrotetracyklinu má poměr signálu k šumu nejméně 3. Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztok (f). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího 4-epitetracyklinu, anhydrotetracyklinu nebo 4-epianhydrotetracyklinu není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (3,0 %, 0,5 %, 0,5 %); plocha žádného píku v sestupné části hlavního píku není větší než 50,0 % plochy píku 4-epitetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (1,5 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,0 %; 1,000 g se suší 3 h při 60 °C nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřekračujícím 670 Pa.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,5 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 15,0 mg *4-epitetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *anhydrotetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 10,0 mg *4-epianhydrotetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). Smíchá se 1,0 ml porovnávacího roztoku (a), 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) a 5,0 ml porovnávacího roztoku (d) a směs se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (f). Smíchá se 20,0 ml porovnávacího roztoku (b), 10,0 ml porovnávacího roztoku (c) a 5,0 ml porovnávacího roztoku (d) a směs se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (g). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: naváží se 80,0 g *terc.butanolu R* a přenese se do odměrné baňky na 1000 ml za pomoci 200 ml *vody R*. Přidá se 100 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu draselného R* (35 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou RS* na hodnotu 9,0, 200 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným RS* na 9,0, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (40 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným RS* na hodnotu 9,0, a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 μl.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C. Nastříkne se porovnávací roztok (e). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodno-

tit, jestliže na chromatogramu není rozlišení mezi prvním píkem (4-epitetracyklin) a druhým píkem (tetracyklin) menší než 2,5 a rozlišení mezi druhým píkem a třetím píkem (4-epianhydrotetracyklin) není menší než 8,0. Podle potřeby se přizpůsobí koncentrace *terc.butanolu R* v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, je-li faktor symetrie druhého píku nejvýše 1,25. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku tetracyklinu nejvýše 1 %. Podle potřeby se nastaví integrátor. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikuje střídavě.

Obsah tetracykliniumchloridu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

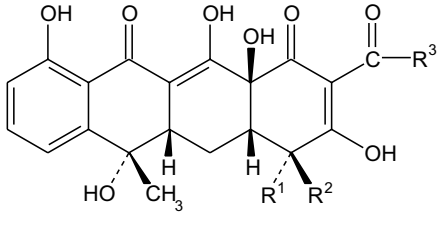
Ve vduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

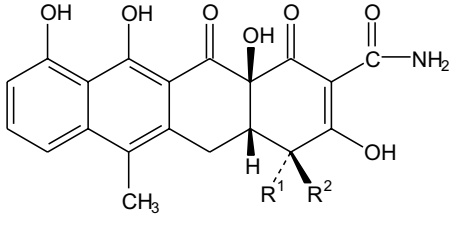
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty



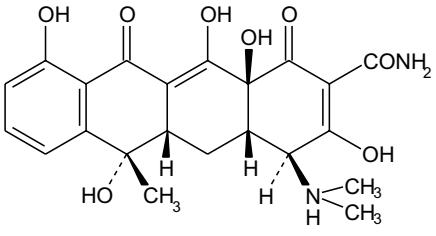
A. $R^1 = N(CH_3)_2$; $R^2 = H$; $R^3 = NH_2$: 4-epitetracyklin,
B. $R^1 = H$; $R^2 = N(CH_3)_2$; $R^3 = CH_3$: 2-acetyl-2-dikarboxamidotetracyklin,



C. $R^1 = H$; $R^2 = N(CH_3)_2$: anhydrotetracyklin,
D. $R^1 = N(CH_3)_2$; $R^2 = H$: 4-epianhydrotetracyklin.

† Tetracyclinum

Tetracyklin



$C_{22}H_{24}N_2O_8$ M_r 444,44 CAS 60-54-8

Je to (4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naftacenkarboxamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 88,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{22}H_{24}N_2O_8$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a methanolu, mírně rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných kyselých a alkalických roztocích.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*. Vrstva se stejnoměrně postříká roztokem *edetanu disodného R* (100 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na hodnotu 8,0, (asi 10 ml na desku rozměrů 100 mm x 200 mm). Vrstva se suší nejméně 1 h ve vodorovné poloze. Před použitím se vrstva 1 h zahřívá v sušárně při 110 °C.

Zkoušený roztok. 5 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 mg *tetracykliniumchloridu CRL*, 5 mg *chlortetracykliniumchloridu CRL* a 5 mg *doxycykliniumhyklatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (6 + 35 + 59) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, barvou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně oddělené skvrny.

B. K asi 2 mg látky se přidá 5 ml *kyseliny sírové R;* vzniká fialově červené zbarvení. Roztok se přidá k 2,5 ml *vody R;* zbarvení se změní ve žluté.

C. Asi 10 mg látky se rozpustí ve směsi 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a 5 ml *vody R*. Protřepe se a přidá se 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2*. Opalescence roztoku není intenzivnější než opalescence směsi 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 5 ml *vody R* a 1 ml *dusičnanu stříbrného RS2*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 6,0; měří se suspenze 0,1 g zkoušené látky v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -260° až -280°, počítáno na vysušenou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředěním stejnou kyselinou na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) způsobem popsaným ve Stanovení obsahu. Nastříkne se porovnávací roztok (g). Zkoušku lze hodnotit, jestliže pík odpovídající anhydrotetracyklinu má poměr signálu k šumu nejméně 3. Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztok (f). Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha žádného píku odpovídajícího 4-epitetracyklinu nebo anhydrotetracyklinu nebo 4-epianhydrotetracyklinu není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (5,0 %, 0,5 % a 1,0 %); plocha žádného píku v sestupné části hlavního píku není větší než 40,0 % plochy píku 4-epitetracyklinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (f) (2,0 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (50 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 2,5 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 13 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 25,0 mg *tetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 12,5 mg *4-epitetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *anhydrotetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 10,0 mg *4-epianhydrotetracykliniumchloridu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). Smíchá se 1,0 ml porovnávacího roztoku (a), 2,0 ml porovnávacího roztoku (b) a 5,0 ml porovnávacího roztoku (d) a směs se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (f). Smíchá se 40 ml porovnávacího roztoku (b), 20,0 ml porovnávacího roztoku (c) a 5,0 ml porovnávacího roztoku (d) a směs se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 200,0 ml.
Porovnávací roztok (g). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (8 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí připravenou následujícím způsobem: naváží se 80,0 g *terc.butanolu R* a převede se do odměrné baňky na 1000 ml za pomoci 200 ml *vody R*. Přidá se 100 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu draselného R* (35 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou RS* na hodnotu 9,0, 200 ml roztoku *tetrabutylamoniumhydrogensulfatu R* (10 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným RS* na hodnotu 9,0, a 10 ml roztoku *edetanu disodného R* (40 g/l), jehož pH bylo upraveno *hydroxidem sodným RS* na 9,0, a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm,
- pevné injektorové smyčky, 20 μl.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C. Nastříkne se porovnávací roztok (e). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška píků nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu není rozlišení mezi prvním píkem (4-epitetracyklin) a druhým píkem (tetracyklin) menší než 2,5 a rozlišení mezi druhým píkem a třetím píkem (4-epianhydrotetracyklin) není menší než 8,0. Podle potřeby se přizpůsobí koncentrace *terc.butanolu* R v mobilní fázi. Zkoušku lze hodnotit, je-li faktor symetrie druhého píku nejvýše 1,25. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok (a). Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka plochy píku tetracyklinu nejvýše 1 %. Podle potřeby se nastaví integrátor. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se vstřikují střídavě.

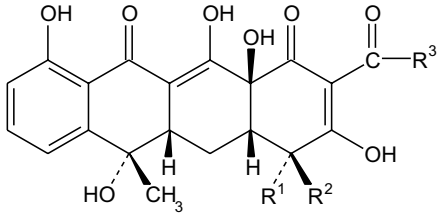
Obsah tetracyklinu se vypočítá v procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

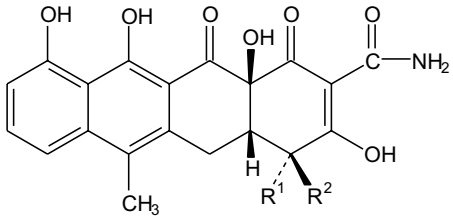
Separandum.

Nečistoty



A. $R^1 = N(CH_3)_2$; $R^2 = H$; $R^3 = NH_2$: 4-epitetracyklin,

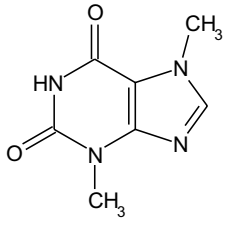
B. $R^1 = H$; $R^2 = N(CH_3)_2$; $R^3 = CH_3$: 2-acetyl-2-dikarboxamidotetracyklin,



C. R^1 = H; R^2 = $N(CH_3)_2$: anhydrotetracyklin,
D. R^1 = $N(CH_3)_2$; R^2 = H: 4-epianhydrotetracyklin.

† Theobrominum

Theobromin



$C_7H_8N_4O_2$ M_r 180,17 CAS 83-67-0

Je to 3,7-dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_8N_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v ethanolu, těžce rozpustný v amoniaku, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a v minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *theobrominu CRL.*

B. Asi 20 mg se rozpustí mírným zahřátím ve 2 ml *amoniaku zředěného RS1* a po ochlazení se přidají 2 ml *dusičnanu stříbrného RS2;* roztok zůstane čirý. Pak se několik minut povaří; vylučuje se bílá krystalická sraženina.

C. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. K 0,4 g se přidá 20 ml *vody R*, 1 min se vaří, ochladí se a zfiltruje. Přidá se 0,05 ml *modře bromthymolové RS1;* roztok je žlutý nebo žlutozelený. Na změnu indikátoru do modrého zbarvení se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G-F_{254} R.*

Zkoušený roztok. K 0,2 g jemně upráškované zkoušené látky se přidá 10 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) a 15 min se zahřívá na vodní lázni pod zpětným chladičem za občasného protřepání. Ochladí se a zfiltruje.
Porovnávací roztok. 5 mg *theobrominu CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) a zředí se jí na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R*, *chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Žádná ze skvrn na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,00 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 125 ml vroucí *vody R*, ochladí se na 50 °C až 60 °C a přidá se 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS*. Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do růžového zbarvení za použití 1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,02 mg $C_7H_8N_4O_2$.

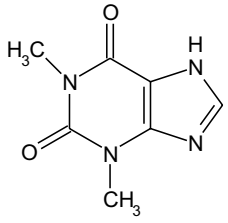
Uchovávání

Separandum.

---

† Theophyllinum

Theofylin



$C_7H_8N_4O_2$ M_r 180,17 CAS 58-55-9

Je to 1,3-dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_8N_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v ethanolu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů, v amoniaku a v minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 270 °C až 274 °C; stanoví se po vysušení při 100 °C až 105 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *theofylinu CRL*.

C. K 10 mg se přidá 1,0 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (360 g/l), zahřívá se 3 min ve vodní lázni 90 °C teplé a potom se přidá 1,0 ml *kyseliny diazobenzensulfonové RS1;* vzniká červené zbarvení. Provede se slepá zkouška.

D. Zkouška Ztráta sušením, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

E. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se jí zředí na 75 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně červeného zbarvení roztoku na žluté se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R*, *chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidá se 20 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a protřepe se. Potom se přidá 1 ml *modři bromthymolové RS1* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do modrého zbarvení.

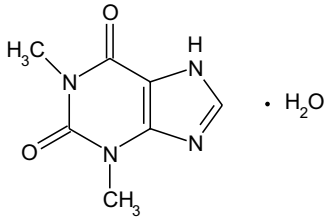
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,02 mg $C_7H_8N_4O_2$.

Uchovávání

Separandum.

† Theophyllinum monohydricum

Monohydrát theofylinu



$C_7H_8N_4O_2 \cdot H_2O$ M_r 198,18 CAS 5967-84-0

M_r bezvodého 180,17

Je to monohydrát 1,3-dimethyl-2,6(1*H*,3*H*)-purindionu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_7H_8N_4O_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů, v amoniaku a v minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 270 °C až 274 °C; stanoví se po vysušení při 100 °C až 105 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *theofylinu CRL*. Zkouška se provede s látkou vysušenou při 100 °C až 105 °C.

C. K 10 mg se přidá 1,0 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (360 g/l), zahřívá se 3 min ve vodní lázni 90 °C teplé a potom se přidá 1,0 ml *kyseliny diazobenzensulfonové RS1;* vzniká červené zbarvení. Provede se slepá zkouška.

D. Zkouška na čistotu Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*, je zároveň zkouškou totožnosti.

E. Vyhovuje zkoušce na xanthiny *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí zahřátím ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a po ochlazení se jí zředí na 75 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. K 50 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně červeného zbarvení roztoku na žluté se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *methanolu R* a *chloroformu R* (4 + 6) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *acetonu R*, *chloroformu R* a *1-butanolu R* (10 + 30 + 30 + 40) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 8 % až 9,5 %; provede se s 1,00 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,160 g se rozpustí ve 100 ml *vody R*, přidá se 20 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a protřepe se. Potom se přidá 1 ml *modři bromthymolové RS1* jako indikátoru a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* do modrého zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,02 mg $C_7H_8N_4O_2$.

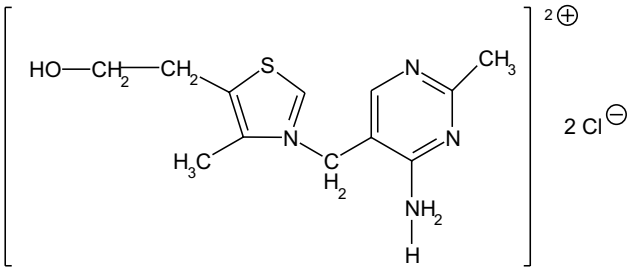
Uchovávání

Separandum.

† Thiamini hydrochloridum

Thiaminiumchlorid

Synonyma. Thiaminium dichloratum, vitamin B_1



$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ M_r 337,27 CAS 67-03-8

Je to 3-(4-amonio-2-methyl-5-pyrimidinylmethyl)-4-methyl-(2-hydroxyethyl)thiazoliumdichlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,5 % až 101,5 % sloučeniny $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystalky. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v glycerolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *thiaminium-chloridu CRL*. Jestliže spektra vykazují rozdíly, rozpustí se jednotlivě zkoušená látka a referenční látka ve *vodě R*, roztoky se odpaří do sucha a zaznamenají se spektra odparků.

B. Asi 20 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 1,6 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, 10 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*, 10 ml *1-butanolu R* a 2 min se intenzivně protřepává; horní lihová vrstva intenzivně světle modře fluoreskuje, zejména v ultrafialovém světle při 365 nm. Zkouška se opakuje, přičemž se místo 1,6 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* použije 0,9 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 0,2 g *siřičitanu sodného R;* nevznikne prakticky žádná fluorescence.

C. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* (připravené z *vody destilované R*) a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. 2,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5 ml. Vzniklý roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok $Ž_7$ nebo $ZŽ_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,7 až 3,3; měří se 2,5 ml roztoku S zředěného na 10 ml *vodou prostou oxidu uhličitého R*.

Dusičnany. K 0,4 ml roztoku S se přidá 1,6 ml *vody R*, 2 ml *kyseliny sírové R* a ochladí se. Na tento roztok se navrství 2 ml roztoku *síranu železnatého R* (80 g/l) připraveného v čas potřeby za použití *vody prosté oxidu uhličitého R;* na styku obou vrstev nevznikne hnědý prstenec.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou destilovanou R* vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (2 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,40 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 65 ml *kyseliny octové bezvodé R*, za míchání se přidá 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

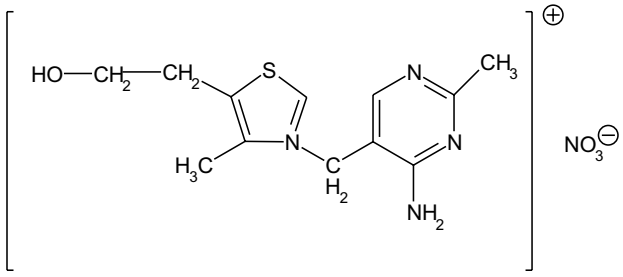
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,86 mg $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$.

Uchovávání

V dobře uzavřených nekovových obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Thiamini nitras

Thiaminiumnitrat



$C_{12}H_{17}N_5O_4S$ M_r 327,36 CAS 532-43-4

Je to 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumnitrat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{12}H_{17}N_5O_4S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo malé bezbarvé krystalky. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *thiaminiumnitratu CRL.*

B. Asi 20 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 1 ml *kyseliny octové zředěné RS*, 1,6 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, 10 ml *hexakyanoželezitanu draselného RS*, 10 ml *1-butanolu R* a 2 min se intenzivně protřepává; horní lihová vrstva intenzivně světle modře fluoreskuje, zejména v ultrafialovém světle při 365 nm. Zkouška se opakuje, přičemž se místo 1,6 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* použije 0,9 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 0,2 g *siřičitanu sodného R;* nevznikne prakticky žádná fluorescence.

C. Asi 5 mg zkoušené látky vyhovuje zkoušce na dusičnany *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,8 až 7,6; měří se roztok S.

Chloridy *(2.4.4)*. 8,3 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (300 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se zahřívá v sušárně při 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,140 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 70 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence. Provede se slepá zkouška.

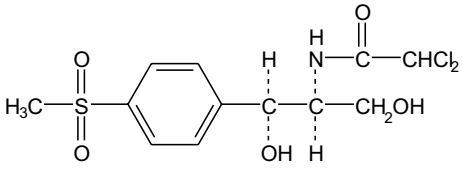
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 16,37 mg $C_{12}H_{17}N_5O_4S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených nekovových obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Thiamphenicolum

Thiamfenikol



$C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$ M_r 356,22 CAS 15318-45-3

Je to 2,2-dichlor-N-[(1*R*,2*R*)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(4-methylsulfonyfenyl)ethyl]acetamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý jemný krystalický prášek nebo krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, v etheru a v ethylacetatu, velmi snadno rozpustný v dimethylacetamidu, snadno rozpustný v acetonitrilu a v dimethylformamidu, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v acetonu a v ethanolu.

Roztok v ethanolu je pravotočivý, roztok v dimethylformamidu je levotočivý.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *thiamfenikolu CRL.* Měří se tablety připravené z vysušených látek (2 h při 100 °C až 105 °C) a *bromidu draselného R.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 0,1 g *thiamfenikolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *ethylacetatu R* (3 + 97) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. K 50 mg v porcelánovém kelímku se přidá 0,5 g *uhličitanu sodného bezvodého R*, 10 min se zahřívá nad otevřeným plamenem a nechá se ochladit. Ke zbytku se přidá 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zfiltruje se. K 1 ml filtrátu se přidá 1 ml *vody R;* roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,1 g se protřepává s 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a přidá se 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,02 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS.*

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -21° až -24°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g v *dimethylformamidu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Teplota tání (*2.2.14*). 163 °C až 167 °C.

Absorbance (*2.2.25*). 20 mg se rozpustí ve *vodě R*, zahřeje se na asi 40 °C a zředí se stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku při 240 nm až 300 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 266 nm a při 273 nm. Specifická absorbance v maximu při 266 nm je 25 až 28, specifická absorbance v maximu při 273 nm je 21,5 až 23,5.

2,5 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 50,0 ml a měří se absorbance roztoku při 200 nm až 240 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 224 nm. Specifická absorbance v maximu je 370 až 400.

Chloridy (*2.4.4*). 0,5 g se protřepává 5 min s 30 ml *vody R* a zfiltruje se. 15 ml filtrátu vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 30 ml *lihu 96% R*, přidá se 20 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (500 g/l), zamíchá se a zahřívá se 4 h pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 100 ml *vody R*, zneutralizuje se *kyselinou dusičnou zředěnou RS* a navíc se přidá ještě 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*. Titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence za použití stříbrné indikační elektrody a merkurosulfatové srovnávací elektrody nebo jiné vhodné elektrody. Provede se slepá zkouška.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 17,81 mg $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$.

Uchovávání

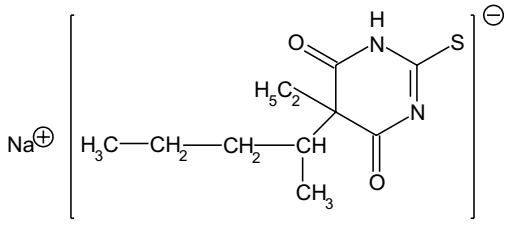
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

Separandum.

† Thiopentalum natricum et natrii carbonas

Sodná sůl thiopentalu a uhličitan sodný

Synonyma. Thiopentalum natricum, Thiopentalum solubile



CAS 71-73-8 (sodná sůl thiopentalu)

Je to směs sodné soli kyseliny (*RS*)-5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbiturové ($C_{11}H_{17}N_2NaO_2S$; M_r 264,32) a bezvodého uhličitanu sodného. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 84,0 % až 87,0 % thiopentalu ($C_{11}H_{18}N_2O_2S$; M_r 242,34) a 10,2 % až 11,2 % sodíku (Na; A_r 22,99).

Vlastnosti

Žlutavě bílý hygroskopický prášek, snadno rozpustný ve vodě, částečně rozpustný v ethanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A, B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se okyselí *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS;* roztok šumí. Po vyšumění se roztok protřepe s 20 ml *etheru R*, etherová vrstva se oddělí, promyje se 10 ml *vody R*, vysuší se *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Filtrát se odpaří do sucha, zbytek po odpaření se vysuší při 100 °C až 105 °C (zbytek zkoušené látky) a stanoví se jeho teplota tání (*2.2.14*). Smíchají se stejné díly zbytku zkoušené látky a *thiopentalu CRL* a stanoví se teplota tání směsi. Získané teploty tání (asi 160 °C) se od sebe liší nejvýše o 2 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zbytku zkoušené látky, viz zkouška totožnosti A, se shoduje se spektrem *thiopentalu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok. 85 mg *thiopentalu CRL* se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se *vodou R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 18 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce na barbituráty nesubstituované na dusíku (*2.3.1*).

E. Vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 5,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $ZŽ_3$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml. Nepřihlíží se k nerozpuštěnému zbytku.

Porovnávací roztok. 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se spodní vrstvou směsi objemových dílů *amoniaku 26% R*, *lihu 96% R* a *chloroformu R* (5 + 15 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se ihned pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %). Nepřihlíží se ke skvrnám na startu.

Chloridy (*2.4.4*). K 5 ml roztoku S se přidá 35 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, třikrát se protřepe vždy s 25 ml *etheru R* a etherové vrstvy se odstraní. Z vodné vrstvy se odstraní ether zahřátím na vodní lázni. 15 ml vodné vrstvy vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (330 µg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2,5 %; 0,500 g se 4 h suší ve vakuu při 100 °C.

Stanovení obsahu

Sodík. 0,400 g se rozpustí ve 30 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *červeně methylové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do červeného zbarvení. Pak se 2 min mírně povaří, ochladí se, a je-li třeba, znovu se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do červeného zbarvení.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 2,299 mg Na.

Thiopental. 0,150 g se rozpustí v 5 ml *vody R*. Přidají se 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, protřepe se čtyřikrát vždy s 10 ml *chloroformu R*. Chloroformové vrstvy se spojí, zfiltrují a filtrát se odpaří do sucha na vodní lázni. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 30 ml předem zneutralizovaného *dimethylformamidu R* a přidá se 0,1 ml roztoku *modře thymolové R* (2 g/l) v *methanolu R*. Roztok se ihned titruje *methoxidem lithným 0,1 mol/l VS* do modrého zbarvení. Při titraci se roztok chrání před atmosférickým oxidem uhličitým.

1 ml *methoxidu lithného 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,23 mg $C_{11}H_{18}N_2O_2S$.

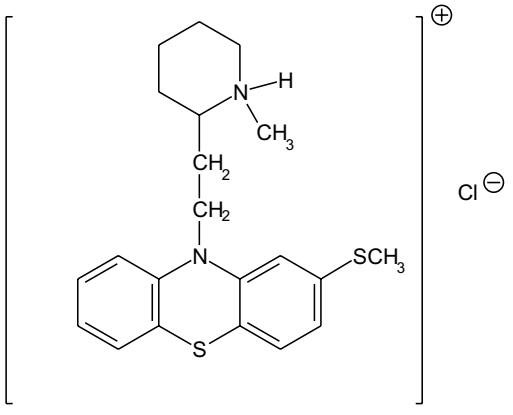
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Thioridazini hydrochloridum

Thioridaziniumchlorid



$C_{21}H_{27}ClN_2S_2$ M_r 407,03 CAS 130-61-0

Je to (*RS*)-1-methyl-2-[2-(2-methylthio-10-fenothiazinyl)ethyl]piperidiniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{27}ClN_2S_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, dobře rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *thioridaziniumchloridu CRL.*

B. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.3*).

C. 0,2 g vyhovují zkoušce (b) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Všechny zkoušky se provedou za chránění před světlem.

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než nejpodobnější porovnávací barevný roztok intenzity 6 (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,2 až 5,2; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,20 g ve 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R. Zkouška se provede co nejrychleji a za chránění před světlem. Zkoušený roztok se nanese jako poslední.*

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) na 100 ml. 10 ml tohoto roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (2 + 98) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R, 2-propanolu R* a *chloroformu R* (1 + 25 + 74) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se nejprve čerstvě připravenou směsí objemových dílů *jodobismutitanu draselného RS* a *kyseliny octové zředěné RS* (1 + 10) a pak čerstvě připraveným *peroxidem vodíku zředěným RS*. Vrstva se ihned přikryje skleněnou deskou o stejné velikosti. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,2 %) a nejvýše dvě takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je zřetelně viditelná.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 60 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

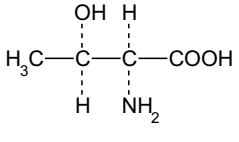
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 40,70 mg sloučeniny $C_{21}H_{27}ClN_2S_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Threoninum

Threonin



$C_4H_9NO_3$ M_r 119,12 CAS 72-19-5

Je to kyselina (2*S*,3*R*)-2-amino-3-hydroxybutanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_4H_9NO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Vyhovuje zkoušce Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *threoninu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 1 ml roztoku zkoušené látky (2 g/l) se smíchá s 1 ml roztoku *jodistanu sodného R* (20 g/l). Přidá se 0,2 ml *piperidinu R* a 0,1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (25 g/l). Vzniká modré zbarvení, které se po několika minutách mění na žluté.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). -27,6° až -29,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,50 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *threoninu CRL* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*) a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *threoninu CRL* a 10 mg *prolinu CRL* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*) a zředí se jím na 25 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku, usuší se na vzduchu a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 0,10 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (200 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 0,2 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,91 mg $C_4H_9NO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Thymi herba

Tymiánová nať

Synonymum. Herba thymi vulgaris

Jsou to usušené celé listy a květy druhu *Thymus vulgaris* L. nebo *Thymus zygis* L. nebo směsi obou druhů oddělené od stonků. Obsahuje nejméně 12 ml silice v 1 kilogramu drogy a nejméně 5 ml těkavých fenolů v 1 kilogramu silice, počítáno jako thymol ($C_{10}H_{14}O$; M_r 150,2), obojí vztaženo na sušinu.

Vlastnosti

Droga ostře aromatického pachu po thymolu.

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. List druhu *Thymus vulgaris* je obvykle 4 mm až 12 mm dlouhý a až 3 mm široký, přisedlý nebo velmi krátce řapíkatý. Čepel tuhá, celokrajná, kopinatá až vejčitá, na obou stranách šedá až zelenošedá s okraji podvinutými. Střední žilka na svrchní straně vpadlá, na spodní straně zřetelně vyniklá. Kalich zelený, často fialově naběhlý, trubkovitý, se dvěma pysky, z nichž horní se třemi ušty je obrácen nazpět, dolní se dvěma brvitými ušty je delší než horní. Po odkvětu

kalich uzavírá korunu dlouhými tuhými chlupy. Koruna dvakrát delší než kalich, v suchém stavu obvykle nahnědlá, nezřetelně dvoupyská.

List druhu *Thymus zygis* je obvykle 1,7 mm až 6,5 mm dlouhý a 0,4 mm až 1,2 mm široký, jehlicovitý až podlouhle kopinatý, podvinutý. Čepel na obou stranách zelená až zelenošedá, střední žilka někdy fialová, okraj listu zejména na bázi s dlouhými bílými chlupy. Usušené květy podobné druhu *Thymus vulgaris*.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek z obou druhů je šedozelený až zelenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: pokožky listů s buňkami se stěnami chobotnatými, tečkovanými; průduchy diacytického typu (*2.8.3*); četné žláznaté chlupy s dvanácti sekrečními buňkami, jejichž kutikula je většinou kulovitě až měchýřovitě vychlípena vylučovaným sekretem. Žláznaté chlupy mají jednobuněčnou nohu a kulovitou až vejčitou hlavičku. U obou druhů na svrchní straně krycí chlupy s bradavčitými stěnami a zašpičatělou koncovou buňkou. Na spodní straně různé typy chlupů s bradavčitými stěnami: jednobuněčné, přímé nebo lehce zahnuté, dvou- až tříbuněčné, často kolenovitě zahnuté (*Thymus vulgaris*); dvou- až tříbuněčné chlupy, víceméně přímé (*Thymus zygis*). Úlomky kalicha s četnými jednořadými, pěti- až šestibuněčnými chlupy se slabě rýhovanou kutikulou. Úlomky koruny s četnými jednořadými často kolabovanými krycími chlupy a žláznatými chlupy s dvanácti sekrečními buňkami. Poměrně zřídka jsou přítomná pylová zrna kulatá, hladká, o průměru asi 35 μm, se šesti štěrbinovitými klíčními póry. Prášek z *Thymus zygis* obsahuje také četné silné svazky vláken z hlavních žilek a z úlomků stonků.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vhodné vrstvy silikagelu s fluorescenční přísadou pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se protřepává 3 min s 5 ml *dichlormethanu R* a zfiltruje se přes 2 g *síranu sodného bezvodého R*. Filtrát se použije jako zkoušený roztok.
Porovnávací roztok. 5 mg *thymolu R* a 10 μl *karvakrolu R* se rozpustí v 10ml *dichlormethanuR*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 20 μl obou roztoků. Vyvíjí se dvakrát *dichlormethanem R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm; skvrny se označí. Na chromatogramech porovnávacího roztoku a zkoušeného roztoku je ve střední části patrna skvrna thymolu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je těsně nad skvrnou odpovídající thymolu intenzivní skvrna, další skvrny jsou patrné v dolní třetině chromatogramu. Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části hnědorůžová skvrna odpovídající thymolu a těsně pod ní světle fialová skvrna odpovídající karvakrolu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku více nebo méně intenzivní v závislosti na zkoušeném druhu. Mezi dvěma hlavními skvrnami a startem jsou čtyři skvrny stejné intenzity; v pořadí klesajících hodnot R_F jsou to: růžová skvrna (cineol), fialová (linalool), šedohnědá (borneol) a fialovomodrá. V blízkosti čela chromatogramu je intenzivní fialovočervená až šedofialová skvrna; další skvrny jsou v okolí startu.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 10 % stonků. Stonky mohou mít průměr nejvýše 1 mm a délku nejvýše 15 mm.

Nejsou přítomny roztroušeně chlupaté části rostliny a listy na bázi s dlouhými chlupy (*Thymus serpyllum* L.).

Voda, stanovení destilací (*2.2.13*). Nejvýše 10,0 %; stanoví se s 20,0 g práškované drogy (355).

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 15,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení obsahu

Silice. Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách (*2.8.12*). 30,0 g drogy se destiluje 2 h rychlostí 2 ml/min až 3 ml/min v baňce na 1000 ml se 400 ml *vody R;* bez přídavku *xylenu R* do dělené trubice.

Fenoly. Silice ze zkoušky Stanovení obsahu se převede opatrně malými dávkami *lihu R* 90% (*V/V*) do odměrné baňky na 50 ml tak, aby obsahovala nejmenší možné množství vody; dělená trubice se propláchne malými dávkami *lihu R* 90% (*V/V*) a odměrná baňka se doplní *lihem R* 90% (*V/V*) po značku. 5,0 ml tohoto roztoku se smíchá se 40 ml *lihu R* 90% (*V/V*) a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se převede do dělicí nálevky, smíchá se s 45 ml *vody R*, 0,5 ml *amoniaku zředěného RS2* a 1 ml roztoku *aminopyrazolonu R* (20 g/l). Po protřepání se smíchá se 4 ml čerstvě připraveného roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (20 g/l) a znovu se protřepe. Po 5 min se protřepává 25 ml *dichlormethanu R*. Dichlormethanová vrstva se zfiltruje chomáčkem vaty povlhčeným *dichlormethanem R* do odměrné baňky na 100 ml. Vodná vrstva se protřepe dvakrát 25 ml *dichlormethanu R* a pak 10 ml *dichlormethanu R*. Dichlormethanové vrstvy se zfiltrují přes chomáček vaty. Vata se promyje *dichlormethanem R* a obsah odměrné baňky se jím zředí na 100,0 ml.

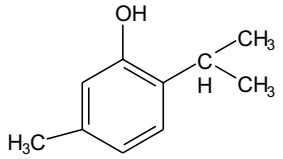
Změří se absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 450 nm za použití *dichlormethanu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah fenolů v procentech, počítáno jako thymol ($C_{10}H_{14}O$). Specifická absorbance je 805.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem a vlhkostí.

Thymolum

Thymol



$C_{10}H_{14}O$ M_r 150,22 CAS 89-83-8

Je to 2-isopropyl-5-methylfenol.

Vlastnosti

Bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru, snadno rozpustný v silicích a mastných olejích, mírně rozpustný v glycerolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 48 °C až 52 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *thymolu CRL.*

C. 0,2 g se zahřátím rozpustí ve 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS,* přidá se 0,2 ml *chloroformu R* a zahřívá se na vodní lázni; vznikne fialové zbarvení.

D. Asi 2 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 0,15 ml *kyseliny sírové R* a 0,05 ml *kyseliny dusičné R;* vzniká modrozelené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS.* Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze IV (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Č_6$ (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele reagující látky. K 1,0 g ve 100ml kuželové zabroušené baňce se skleněnou zátkou se přidá 20 ml *vody R.* Vaří se až do úplného rozpuštění zkoušené látky, ochladí se, baňka se uzavře a intenzivně se 1 min protřepává. Přidá se několik krystalků zkoušené látky pro vyvolání krystalizace, intenzivně se 1 min protřepává a pak se zfiltruje. K 5 ml filtrátu se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS* a 0,05 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l RS;* vznikne žluté zbarvení.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *lihem 96% R* na 10 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné nebo ocelové kolony délky 4 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* impregnovanou směsí vhodnou pro dělení volných mastných kyselin,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 80 °C, teplota vstřikovacího prostoru na 250 °C a teplota detektoru na 300 °C.

Nastříkne se odděleně po 1 µl každého roztoku. Po 2 min se zvýší teplota kolony rychlostí 8 °C/min na 240 °C, při níž se udržuje 15 min. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je poměr signálu k šumu nejméně 5. Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c).

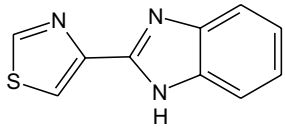
Zbytek po odpaření. 2,00 g se odpaří na vodní lázni a pak se 1 h suší v sušárně při 100 °C až 105 °C; zbytek váží nejvýše 1,0 mg (0,05 %).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Tiabendazolum

Tiabendazol



$C_{10}H_7N_3S$ M_r 201,25 CAS 148-79-8

Je to 2-(1,3-thiazol-4-yl)-1*H*-benzimidazol. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{10}H_7N_3S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, v etheru a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 300 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 25 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 243 nm a 302 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 302 nm k absorbanci naměřené v maximu při 243 nm je 1,8 až 2,1.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tiabendazolu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 5 ml. Přidají se 3 mg *p-fenylendiamoniumdichloridu R* a protřepává se až do rozpuštění, pak se přidá 0,1 g *zinku práškového R*, promíchá se, nechá se 2 min stát a přidá se 5 ml *síranu amonno-železitého RS2;* vzniká modrofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *tiabendazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 25 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *acetonu R*, *kyseliny octové ledové R* a *toluenu R* (2,5 + 10 + 25 + 62,5) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,4 %).

***o*-Fenylendiamin.** K 5,0 g v baňce se zabroušenou zátkou se přidá 25 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (1 + 2), 3 min se protřepává a pak se za sníženého tlaku zfiltruje přes filtr ze slinutého skla (16). K 10 ml filtrátu se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,5 ml *acetylacetonu R* a protřepává se, dokud roztok není čirý; roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Č_7$ (*2.2.2, Metoda I*) (10 µg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové ledové R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,12 mg $C_{10}H_7N_3S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

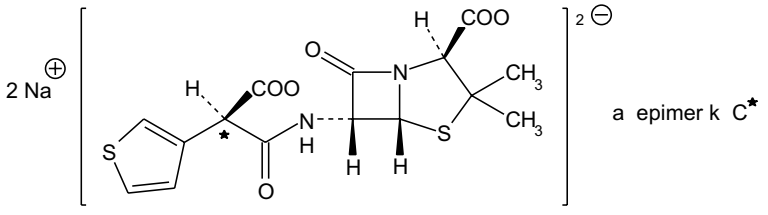
Nečistoty

A. *o*-fenylendiamin.

† Ticarcillinum natricum

1998

Sodná sůl tikarcilinu



$C_{15}H_{14}N_2Na_2O_6S_2$ M_r 428,38 CAS 4697-14-7

Je to disodná sůl kyseliny (6*R*)-6-[(2*RS*)-2-karboxy-2-(3-thienyl)acetamido]penicilanové. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 89,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{15}H_{14}N_2Na_2O_6S_2$.

Výroba

Pokud se vyrábí způsobem, který může v látce zanechat zbytky kyseliny 2-ethylhexanové, vyhovuje následující zkoušce:

Kyselina 2-ethylhexanová. Nejvýše 0,5 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití vhodné validované metody.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v methanolu, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a D.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *sodné soli tikarcilinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu silanizovaného H R*.

Zkoušený roztok. 25 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *sodné soli tikarcilinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 25 mg *sodné soli karbenicilinu CRL* a 25 mg *sodné soli tikarcilinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 1 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R* a roztoku *octanu amonného R* (154 g/l), jehož pH bylo upraveno na 5,0 *kyselinou octovou ledovou R*, (10 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a vystaví se působení par jodu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, barvou a velikostí skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Asi 2 mg se přenesou do zkumavky asi 150 mm dlouhé a o průměru 15 mm, zvlhčí se 0,05 ml *vody R* a přidají se 2 ml *formaldehydu v kyselině sírové RS*. Obsah zkumavky se promíchá krouživým pohybem; roztok je hnědý. Zkumavka se na 1 min vloží do vodní lázně; vzniká tmavě červenohnědé zbarvení.

D. Zkoušená látka vyhovuje zkoušce (a) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,5 až 7,5; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +172° až +187°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok připravený rozpuštěním 0,250 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 20,0 mg *tikarcilinu nečistoty A CRL* se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R*,
- následujících mobilních fází:
  - *mobilní fáze A* - roztok *fosforečnanu amonného R* (1,3 g/l), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 7,0,
  - *mobilní fáze B* - směs stejných objemových dílů mobilní fáze A a *methanolu R* s následujícím elučním programem:

Čas (min)	Mobilní fáze A % (*V/V*)	Mobilní fáze B % (*V/V*)	Poznámky
0 - 30	100 → 30	0 → 70	lineární gradient
30 - 40	30	70	izokraticky
40 - 45	100	0	ustalování

- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Nastaví se citlivost systému tak, aby výška dvou hlavních píků byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky (diastereoizomery) je nejméně 2,0. Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a 20 μl porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha píku odpovídajícího tikarcilinu nečistotě A větší než dvojnásobek hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (4 %) a plocha žádného píku, kromě dvou hlavních píků a píku odpovídajícího tikarcilinu nečistotě A, není větší než 1,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (2,5 %).

Dimethylanilin. Nejvýše 20 μg/g; stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *naftalenu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 50,0 mg *naftalenu R* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *cyklohexanem R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. K 1,00 g zkoušené látky ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se horní vrstva.
Porovnávací roztok. K 50,0 mg *dimethylanilinu R* se přidají 2 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 20 ml *vody R*, třepe se do rozpuštění a zředí se *vodou R* na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 250,0 ml. K 1,0 ml posledního roztoku ve zkumavce se zabroušenou zátkou se přidá 5 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku vnitřního standardu. Zkumavka se uzavře a intenzivně se 1 min třepe. V případě potřeby se odstřeďuje a použije se supernatantní kapalina.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R*, impregnovanou 3 % *polyfenylmethylsiloxanu R*,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a teplota nástřikového prostoru a detektoru je 150 °C. Nastříkne se odděleně 1 μl zkoušeného roztoku a 1 μl porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 5,5 %; stanoví se s 0,150 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,05 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

Stanovení se provede kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok. 50,0 mg *sodné soli tikarcilinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, kterou je směs objemových dílů *methanolu R* a roztoku *fosforečnanu amonného R* (1,3 g/l) (20 + 80), jehož pH bylo upraveno *kyselinou fosforečnou R* na 7,0,
- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku. Citlivost systému se nastaví tak, aby výška dvou hlavních píků na získaném chromatogramu byla nejméně 50 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je nejméně 2,5. Nastříkne se šestkrát porovnávací roztok. Zkoušku lze hodnotit, je-li relativní směrodatná odchylka nejvýše 1,0 %. Zkoušený roztok a porovnávací roztok (a) se nastřikují střídavě.

Obsah sodné soli tikarcilinu se vypočítá ze součtu dvou píků.

Uchovávání

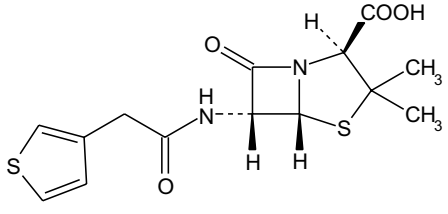
Ve vzduchotěsných obalech, při teplotě od 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

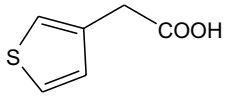
Označování

V označení na obalu se uvede:
- zda je látka sterilní,
- zda je látka prostá bakteriálních endotoxinů.

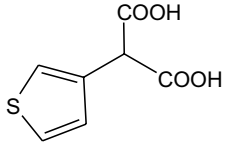
Nečistoty



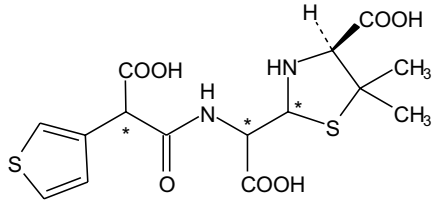
A. kyselina (2*S*,5*R*,6*R*)-3,3-dimethyl-7-oxo-6-{[(3-thienyl)-acetyl]amino}-4-thia-1-azabicyklo-[3,2,0]heptan-2-karboxylová (dekarboxytikarcilin),



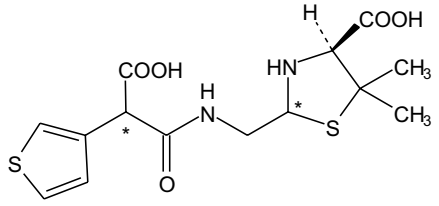
B. kyselina 3-thienyloctová,



C. kyselina 2-(3-thienyl)propandiová (kyselina 3-thienylmalonová),



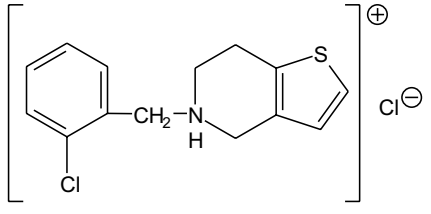
D. kyselina (4*S*)-2-{karboxy[[2-karboxy-2-(3-thienyl)acetyl]amino]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin-4-karboxylová (penicilové kyseliny tikarcilinu),



E. kyselina (4*S*)-2-{[[2-karboxy-2-(3-thienyl)acetyl]amino]]methyl}-5,5-dimethylthiazolidin--4-karboxylová (penilové kyseliny tikarcilinu).

† Ticlopidini hydrochloridum

Tiklopidiniumchlorid



$C_{14}H_{15}Cl_2NS$ M_r 300,25 CAS 53885-35-1

Je to 5-(2-chlorbenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*c*]pyridiniumchlorid. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{15}Cl_2NS$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a v ethanolu, velmi těžce rozpustný v ethylacetatu a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 40 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100,0 ml (roztok A). 5,0 ml roztoku A se zředí *vodou R* na 100,0 ml (roztok B). Měří se absorbance (*2.2.25*) při 200 nm až 350 nm; roztok B vykazuje dvě absorpční maxima, při 214 nm a 232 nm. Pak se měří absorbance při 250 nm až 350 nm; roztok A vykazuje dvě absorpční maxima, při 268 nm a 275 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 268 nm k absorbanci naměřené v maximu při 275 nm je 1,1 až 1,2.

B. Infračervené absorpční spektrum tablety (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tiklopidiniumchloridu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramech zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramech porovnávacího roztoku (b).

D. Asi 6 mg *kyseliny citronové R* se smíchá s 0,3 ml *acetanhydridu R,* přidá se asi 5 mg zkoušené látky a zahřívá se ve vodní lázni při 80 °C; vzniká červené zbarvení.

E. Asi 20 mg vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* 1% (*V/V*) a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,5 až 4,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,5 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití dvou vrstev *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *tiklopidinu nečistoty A CRL* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* na 20 ml. 50 mg *tiklopidiniumchloridu CRL* se rozpustí ve 2 ml tohoto roztoku.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *tiklopidinu nečistoty B CRL* se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml. 50 mg *tiklopidiniumchloridu CRL* se rozpustí v 1 ml tohoto roztoku a zředí se roztokem *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* 0,03% (*V/V*) v *methanolu R* na 20 ml.

A. Na první vrstvu se nanese odděleně 10 µl zkoušeného roztoku (a), 10 µl zkoušeného roztoku (b), 10 µl porovnávacího roztoku (a) a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *1-butanolu R* a *vody R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS1* a zahřívá se 20 min při 100 °C. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající tiklopidinu nečistotě A není intenzivnější než vedlejší skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající tiklopidinu nečistotě A, není intenzivnější než vedlejší skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

B. Na druhou vrstvu se nanese odděleně 10 µl zkoušeného roztoku (a), 10 µl zkoušeného roztoku (b), 10 µl porovnávacího roztoku (b) a 10 µl porovnávacího roztoku (c) a vyvíjí se horní vrstvou směsi objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *1-butanolu R* a *vody R* (10 + 40 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá usušit na vzduchu a postříká se *zkoumadlem jodoplatičitým R.* Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající tiklopidinu nečistotě B není intenzivnější než vedlejší skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající tiklopidinu nečistotě B, není intenzivnější než vedlejší skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %).

Formaldehyd. 0,200 g se rozpustí ve 4,0 ml *vody R*, přidá se 0,4 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a odstřeďuje se. Supernatantní tekutina se zfiltruje přes bavlněnou vatu předem smočenou ve *vodě R*, zředí se *vodou R* na 5,0 ml, převede se do zkumavky a přidá se 5,0 ml *acetylacetonu RS1*. Zkumavka se 40 min zahřívá ve vodní lázni při 40 °C. Zkoušený roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 5,0 ml roztoku formaldehydu (0,8 μg/ml) získaného zředěním základního *roztoku formaldehydu (5 g CH O/ml)* *vodou R* (20 μg/ml). Zkumavky se pozorují ve směru podélné osy zkumavky.

Methanol. Nejvýše 100 μg/ml; provede se head-space plynová chromatografie (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 0,20 g se přenese do 20ml lahvičky, přidá se 1,0 ml *diethylenglykolu R*, uzavře se zátkou s butylkaučukovou membránou a zátka se zajistí hliníkovým uzávěrem.
Porovnávací roztok (a). 1,0 ml *diethylenglykolu R* se převede do 20ml lahvičky, uzavře se a utěsní.
Porovnávací roztok (b). 0,20 g *methanolu bezvodého R* se rozpustí ve 25,0 ml *diethylenglykolu R*. 0,1 ml roztoku se zředí *diethylenglykolem R* na 20,0 ml. 0,5 ml tohoto roztoku a 0,5 ml *diethylenglykolu R* se převede do 20ml lahvičky, uzavře se a utěsní.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzen kopolymerem R* (180 μm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 30 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 170 °C, teplota vstřikovacího prostoru se udržuje na 200 °C a teplota detektoru na 250 °C.

Každý roztok se udržuje 15 min při 115 °C, 1 min se tlakuje a pak se převede do kolony.

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g se rozpustí v roztoku *methanolu R* 85% (*V/V*) a zředí se jím na 20,0 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 10 ml základního *roztoku olova (1 g Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny octové bezvodé R,* přidá se 35 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Nepřihlíží se k inflexnímu bodu na začátku titrace. Provede se slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,02 mg $C_{14}H_{15}Cl_2NS$.

Uchovávání

Separandum.

Nečistoty

A. 2-chlorbenzylamoniumchlorid,
B. bis(tiklopidinium)dichlorid (= 2,8-bis(2-chlorfenyl)-1,2,3,4,6,7,8,9-oktahydropyrido[3,4:3′,2′]thieno[3,2-*c*]pyridiniumchlorid).

Tiliae flos

Lipový květ

Synonymum. Flos tiliae

Jsou to celá usušená květenství druhů *Tilia cordata* MILL., *Tilia platyphyllos* SCOP., *Tilia* x *vulgaris* HEYNE nebo jejich směs.

Vlastnosti

x Droga slabého aromatického pachu, nasládlé, slizovité chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Květenství je žlutozelené. Hlavní stopka květenství nese jazykovitý, blanitý, žlutozelený, téměř lysý listen. Hlavní žilka listenu je dolní polovinou délky srostlá s hlavní stopkou. Květenství je obvykle složené ze dvou až sedmi květů, někdy až ze šestnácti pětičetných květů. Kališní lístky jsou opadavé, až 6 mm dlouhé, na vnitřní straně lysé, na zevní straně a na okrajích pýřité. Korunní lístky jsou tenké, kopisťovité, nažloutle bílé až 8 mm dlouhé, s jemnou žilnatinou, jen na okrajích lístků někdy jednotlivé chlupy. Tyčinky četné, volné, obvykle uspořádané do pěti svazků. Semeník svrchní, čnělka s pětilaločnou bliznou.

B. Květenství se rozdělí na jednotlivé části a pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Pokožka listenu na svrchní straně z buněk s antiklinálními stěnami rovnými nebo jen mírně vlnitě zprohýbanými; na spodní straně buňky pokožky s antiklinálními stěnami vlnitě zprohýbanými, průduchy anomocytické (*2.3.8*). Jednotlivé buňky mezofylu s malými drúzami šťavelanu vápenatého. V parenchymu kalicha, zejména v blízkosti žilek četné slizové buňky a buňky s malými drúzami šťavelanu vápenatého. Pokožka kalicha na svrchní straně se zahnutými jednobuněčnými ztlustlými krycími chlupy nebo hvězdovitými chlupy, složenými až z pěti větví. Pokožka koruny z buněk s antiklinálními stěnami přímými, krytá zvrásněnou kutikulou, bez průduchů.

V parenchymu koruny drobné drúzy šťavelanu vápenatého a zejména v horní části lístků slizové buňky. Pylová zrna oválná až nevýrazně trojhranná, o průměru 30 μm až 40 μm, s třemi klíčními póry a jemně zrnitou exinou. Semeník lysý nebo pýřitý s chlupy často výrazně zprohýbanými, jednobuněčnými nebo hvězdovitými, složenými ze dvou až čtyř větví.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 65 °C. Po ochlazení se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 2,0 mg *kyseliny kávové R*, 5 mg *hyperosidu R* a 5 mg *rutinu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *2-butanonu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 30 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se suší při 100 °C až 105 °C a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pak se postříká roztokem *makrogolu 400 R* (50 g/l) v *methanolu R*. Vrstva se suší 30 min a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou patrny skvrny v pořadí vzrůstající

hodnoty R_F odpovídající rutinu a hyperosidu fluoreskující žlutooranžově až hnědooranžově a skvrna odpovídající kyselině kávové fluoreskující zelenomodře. Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrna fluoreskuje hnědožlutě až oranžově. Nachází se v poloze těsně nad skvrnou hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku. V denním světle tato skvrna zřetelně vyniká mezi ostatními. Skvrna odpovídající polohou rutinu fluoreskuje také hnědožlutě. Pod ní mohou být dvě skvrny fluoreskující žlutě. Mezi skvrnami rutinu a hyperosidu jsou skvrny fluoreskující oranžově a žlutě. Mezi skvrnami hyperosidu a kyseliny kávové je až pět skvrn fluoreskujících žlutě až oranžově. Těsně pod skvrnou kyseliny kávové je patrna skvrna fluoreskující modře.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 %, stanoví se s 30 g drogy.

Nejsou přítomna květenství s listenem na spodní straně s hvězdovitými chlupy složenými z pěti až osmi větví, s květy se zdánlivě dvouřadou korunou tvořenou přeměnou pěti tyčinek v petální staminodia a květy, které nemají laločnatou nebo vroubkovanou bliznu. Šestičetné květy mohou být přítomny jen výjimečně (*Tilia americana* L., *Tilia tomentosa* MOENCH).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %, 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 C až 105 C.

Celkový popel (*2.4.16*) Nejvýše 8,0 %.

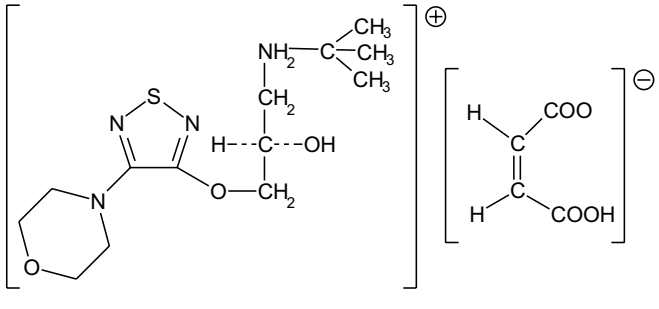
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Timololi hydrogenomaleas

Timololiumhydrogenmaleinat

Synonyma. Timololi maleas, Timololium hydrogenmaleinicum



$C_{17}H_{28}N_4O_7S$ $_r$ 432,49 CAS 26921-17-5

Je to (*S*)-N-[2-hydroxy-3-(4-morfolino-1,2,5-thiadiazol-3-yloxy)propyl]-terc.butylamoniumhydrogenmaleinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{28}N_4O_7S$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 199 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *timololiumhydrogenmaleinatu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu, po vystavení působení jodových par. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. 0,1 g se rozetře se směsí obsahující 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 3 ml *vody R* a třikrát se protřepává vždy s 5 ml *etheru R.* K 0,1 ml vodné vrstvy se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; nevzniká fialově červené zbarvení. Zbytek vodné vrstvy se zneutralizuje *kyselinou sírovou zředěnou RS*, přidá se 1 ml *bromové vody R*, zahřívá se 15 min na vodní lázni, pak se zahřeje k varu a ochladí. K 0,2 ml tohoto roztoku se přidá roztok 10 mg *resorcinolu R* ve 3 ml *kyseliny sírové R* a zahřívá se 15 min na vodní lázni; vzniká fialově červené zbarvení. Přidají se 0,2 ml roztoku *bromidu draselného R* (100 g/l) a zahřívá se 5 min na vodní lázni; vznikne fialově modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok H_8 *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH. 3,8 až 4,3; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -5,7° až -6,2°; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,000 g v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředěním stejnou kyselinou na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok (a). 0,5 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *timololiumhydrogenmaleinatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (1 + 20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu

porovnávacího roztoku (b) (0,4 %). Nepřihlíží se ke skvrně zůstávající na startu. Vrstva se vystaví na 2 h působení jodových par. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,4 %). Nepřihlíží se ke skvrně zůstávající na startu.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 0,500 g se suší v sušárně při 100 C až 105 C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,350 g se rozpustí v 60 ml *kyseliny octové bezvodé R*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 43,25 mg $C_{17}H_{28}N_4O_7S$.

Uchovávání

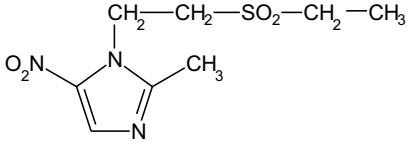
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

---

† Tinidazolum

Tinidazol



$C_8H_{13}N_3O_4S$ $_r$ 247,27 CAS 19387-91-8

Je to 1-(2-ethylsulfonylethyl)-2-methyl-5-nitroimidazol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{13}N_3O_4S$.

Vlastnosti

Téměř bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, mírně rozpustný v methanolu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*): 125 C až 128 C.

B. 10,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml roztoku se zředí *methanolem R* na 10,0 ml. Měří se absorbance (*2.2.25*) tohoto roztoku v rozmezí 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 310 nm. Specifická absorbance v maximu je 340 až 360.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tinidazolu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) polohou a velikostí odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. K asi 10 mg se přidá asi 10 mg *zinku práškového R*, 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 1 ml *vody R*. Zahřívá se 5 min ve vodní lázni a ochladí se. Roztok vyhovuje zkoušce na primární aromatické aminy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí pomocí ultrazvukové lázně v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *tinidazolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 4 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *2-methyl-5-nitroimidazolu R* (tinidazol nečistota A) se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (e). 10 mg *tinidazol nečistoty B CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Vrstva se zahřívá 1 h při 110 °C a nechá se vychladnout. Na vrstvu se nanese po 10 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *1-butanolu R* a *ethylacetatu R* (25 + 75) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) skvrny odpovídající *tinidazolu nečistotě A* a *tinidazolu nečistotě B* nejsou intenzivnější než příslušná skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) a porovnávacího roztoku (e) (0,5 %). Žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající *tinidazolu nečistotě A* a *tinidazolu nečistotě B* na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 25 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,73 mg $C_8H_{13}N_3O_4S$.

Uchovávání

V dobře uzavřeném obalu, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. 2-methyl-5-nitroimidazol,
B. 1-(2-ethylsulfonylethyl)-2-methyl-4-nitroimidazol.

Titanii dioxidum

Oxid titaničitý

Synonyma. Titanium dioxydatum, běloba titanová

TiO_2 M_r 79,88 CAS 13463-67-7

Obsahuje 98,0 % až 100,5 % TiO_2.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě. Nerozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách, ale pomalu se rozpouští v horké koncentrované kyselině sírové.

Zkoušky totožnosti

A. Za silného zahřívání slabě žloutne, při ochlazení se odbarví.

B. K 5 ml roztoku S2, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 0,1 ml *peroxidu vodíku koncentrovaného R;* vznikne oranžově červené zbarvení.

C. K 5 ml roztoku S2 se přidá 0,5 g granulovaného *zinku R;* po 45 min má směs fialovomodré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S1. 20,0 g se 1 min protřepává s 30 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Přidá se 100 ml *vody destilované R* a zahřeje se k varu. Horká směs se filtruje přes tvrzený papírový filtr, dokud filtrát není čirý. Filtr se promyje 60 ml *vody destilované R*, filtrát a promývací kapalina se spojí a zředí se *vodou destilovanou R* na 200 ml.

Roztok S2. 0,500 g (*m*) se smíchá s 5 g *síranu sodného bezvodého R* v 300ml spalovací baňce s dlouhým hrdlem. Přidá se 10 ml *vody R* a promíchá se. Přidá se 10 ml *kyseliny sírové R* a prudce se vaří za dodržení obvyklých bezpečnostních opatření, dokud roztok není čirý. Ochladí se, pomalu se přidává ochlazená směs obsahující 30 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny sírové R*, znovu se ochladí a zředí se *vodou R* na 100,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S2 neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 5,0 g se 5 min protřepává s 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Odstřeďuje se nebo filtruje, dokud roztok není čirý. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,1 ml *modře bromthymolové RS1*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Látky rozpustné ve vodě. K 10,0 g se přidá roztok 0,5 g *síranu amonného R* ve 150 ml *vody R* a 5 min se vaří. Ochladí se, zředí se *vodou R* na 200 ml a filtruje se, dokud roztok není čirý. 100 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha ve zvážené odpařovací misce a žíhá se; zbytek váží nejvýše 25 mg (0,5 %).

Antimon. K 10 ml roztoku S2 se přidá 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R*. Pokud je to nutné, ochladí se na 20 °C a přidá se 0,15 ml *dusitanu sodného RS*. Po 5 min se přidá 5 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (10 g/l) a 10 ml čerstvě připraveného roztoku *rhodaminu B R* (0,1 g/l) a po každém přidání se důkladně promíchá. Přidá se 10,0 ml *toluenu R*, 1 min se intenzivně třepe, vrstvy se nechají oddělit nebo, pokud je to nutné, 2 min se odstřeďuje. Růžové zbarvení toluenové fáze není intenzivnější než růžové zbarvení toluenové fáze porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 5,0 ml základního *roztoku antimonu (1 μg Sb/ml)*, 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 15 ml roztoku obsahujícího 0,5 g *síranu sodného bezvodého R* a 2 ml *kyseliny sírové R* místo směsi obsahující 10 ml roztoku S2, 10 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 10 ml *vody R* (100 μg/g).

Arsen *(2.4.2)*. 0,50 g se umístí do 250ml baňky s kulatým dnem vybavené teploměrem, dělicí nálevkou a trubicí odvádějící páry do baňky obsahující 30 ml *vody R*. Přidá se 50 ml *vody R*, 0,5 g *hydraziniumsulfatu R*, 0,5 g *bromidu draselného R* a 20 g *chloridu sodného R*. Dělicí nálevkou se po kapkách přidává 25 ml *kyseliny sírové R*, zahřeje se a teplota se 20 min udržuje na 110 °C až 115 °C. Páry se jímají v baňce obsahující 30 ml *vody R* a pak se zředí *vodou R* na 50 ml. 20 ml roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Baryum. K 10 ml roztoku S1 se přidá 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*. Po 30 min roztok neopalizuje intenzivněji než směs obsahující 10 ml roztoku S1 a 1 ml *vody destilované R*.

Těžké kovy (*2.4.8*). 10 ml roztoku S1 se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Železo. K 8 ml roztoku S2 se přidají 4 ml *vody R* a promíchá se. Pak se přidá 0,05 ml *bromové vody R*, nechá se 5 min stát a přebytek bromu se odstraní proudem vzduchu. Přidají se 3 ml *thiokyanatanu draselného RS*. Zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi obsahující 4 ml základního *roztoku železa (2 μg Fe/ml)* a 8 ml roztoku *kyseliny sírové R* (200 g/l) (200 μg/g).

Stanovení obsahu

K 300 g granulovaného (710) *zinku R* se přidá 300 ml roztoku *dusičnanu rtuťnatého R* (20 g/l) a 2 ml *kyseliny dusičné R*, 10 min se protřepává a pak se promyje *vodou R*. Amalgamovaný zinek se naplní do skleněné trubice asi 400 mm dlouhé s průměrem asi 20 mm vybavené kohoutkem a fritou. Kolona se promývá 100 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a pak 100 ml *vody R*, aby byl amalgám stále smáčen kapalinou. Do kolony se pomalu zavádí rychlostí asi 3 ml/min směs obsahující 100 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 100 ml *vody R* a pak 100 ml *vody R*. Eluát se jímá v 500ml kuželové baňce obsahující 50,0 ml roztoku *síranu amonno-železitého R* (150 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (1 + 3). Přidá se 0,1 ml *feroinu R* a ihned se titruje *hexanitratoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku nazelenalého zbarvení (n_1 ml). Do kolony

se pomalu zavádí rychlostí asi 3 ml/min nejprve směs obsahující 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 50 ml *vody R*, pak 20,0 ml roztoku S2, pak směs obsahující 50 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 50 ml *vody R* a nakonec 100 ml *vody R*. Eluát se jímá do 500ml kuželové baňky obsahující 50,0 ml roztoku *síranu amonno-železitého R* (150 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (1 + 3). Spodní část kolony se propláchne *vodou R*, přidá se 0,1 ml *feroinu R* a ihned se titruje *hexanitratoceričitanem amonným 0,1 mol/l VS* do vzniku nazelenalého zbarvení (n_2 ml).

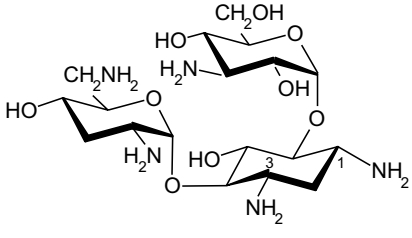
Obsah TiO_2 v procentech se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{3,99\ (n_2 - n_1)}{m},$$

v němž značí:
m - hmotnost zkoušené látky použité k přípravě roztoku S2 v gramech.

† Tobramycinum

Tobramycin



$C_{18}H_{37}N_5O_9$ $_r$ 467,52 CAS 32986-56-4

Je to O-3-amino-3-deoxy-α-D-glukopyranosyl-(1 6)-O-[2,6-diamino-2,3,6-trideoxy-α-D-*ribo*-hexopyranosyl-(1 4)]-2-deoxy-D-streptamin, antibiotikum produkované mikroorganismem *Streptomyces tenebrarius* nebo získané jiným způsobem. Účinnost je nejméně 930 m.j. v miligramu, počítáno na bezvodou a 2-methyl-1-propanolu prostou látku.

Výroba

Vyrábí se metodami umožňujícími snížit nebo odstranit hypotenzivní látky.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Spektrum nukleární magnetické rezonance (*2.2.33*) roztoku zkoušené látky (100 g/l) v *deuteriumoxidu R* se shoduje se spektrem stejného roztoku *tobramycinu CRL*.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 20 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *tobramycinu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 4 mg *neomyciniumsulfatu CRL* a 4 mg *kanamyciniumsulfatu CRL* se rozpustí v 1 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R*, *amoniaku 26 % R* a *methanolu R* (10 + 20 + 30) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší proudem teplého vzduchu a postříká se směsí stejných objemových dílů roztoku 1,3-*dihydroxynaftalenu R* (2 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *kyseliny sírové R* (460 g/l). Zahřívá se 5 min až 10 min při 105 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou tři zřetelně oddělené hlavní skvrny.

C. Asi 5 mg se rozpustí v 5 ml *vody R*. Přidá se 5 ml roztoku *ninhydrinu R* (1 g/l) v *lihu 96% R* a zahřívá se 3 min na vodní lázni; vzniká fialově modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 9,0 až 11,0; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g v 10 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*.

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +138° až +148°, počítáno na bezvodou látku prostou 2-methyl-1-propanolu. Měří se roztok připravený rozpuštěním 1,00 g ve *vodě R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu H R*.

Zkoušený roztok. 80 mg se rozpustí ve směsi objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *vody R* (1 + 99) a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS2* a *vody R* (1 + 99) na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *lihu 96% R*, *amoniaku 26 % R* a *2-butanonu R* po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, pak se 10 min zahřívá při 110 °C a horká se postříká čerstvě připraveným roztokem *chlornanu sodného R* zředěného *vodou R* tak, aby obsahoval 0,5 % volného chloru. Suší se proudem studeného vzduchu tak dlouho, až postříkaná část vrstvy pod linií startu jeví po kapce *škrobu s jodidem draselným RS* velmi slabě modrou barvu. Vrstva se dále nevystavuje studenému vzduchu, ale celá se postříká *škrobem s jodidem draselným RS*. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (1,0 %).

2-Methyl-1-propanol (isobutanol). Nejvýše 1,0 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 2,0 ml *1-propanolu R* se zředí *vodou R* na 500,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v 1,0 ml *vody R*.
Zkoušený roztok (b). 0,20 g se rozpustí v 1,0 ml roztoku vnitřního standardu a přidá se 1,0 ml *vody R*.
Porovnávací roztok. K 0,500 g *isobutanolu R* se přidá 1,0 ml *1-propanolu R* a zředí se *vodou R* na 500,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzenem kopolymerem R* (150 µm až 180 µm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony je 165 °C. Nastříkne se zvolený objem zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 8,0 %; provede se s 0,300 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,3 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 2,0 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*).

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech při teplotě nepřevyšující 25 °C. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Separandum.

Označování

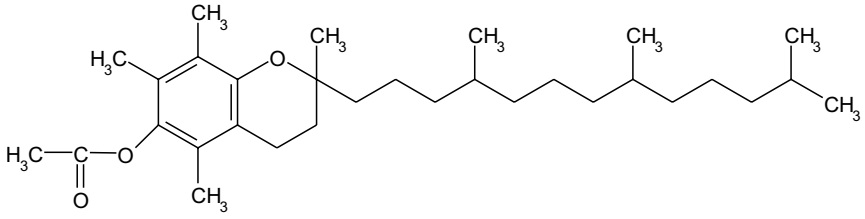
V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

---

† Tocoferoli alfa acetas

Tokoferolacetat alfa

Synonyma. α-Tocopheroli acetas, Tocoferolum aceticum, Tocoferoli acetas, octan vitaminu E



$C_{31}H_{52}O_3$ M_r 472,75 CAS 7695-91-2

Je to 5,7,8-trimethyltokolacetat. Obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{31}H_{52}O_3$.

Vlastnosti

Čirá slabě zelenožlutá viskózní olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v ethanolu, v etheru a v mastných olejích, dobře rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 10 mg se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm *(2.2.25)*. Absorpční maximum roztoku je při 284 nm, prodleva při 278 nm a minimum při 254 nm.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *tokoferolacetatu alfa CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*.

Zkoušený roztok (a). Asi 10 mg se rozpustí ve 2 ml *cyklohexanu R*.
Zkoušený roztok (b). Ve zkumavce se zabroušenou zátkou se rozpustí asi 10 mg ve 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* v *lihu 96% R* (5 mol/l) a 5 min se zahřívá na vodní lázni. Po ochlazení se přidají 2 ml *vody R*, 2 ml *cyklohexanu R* a 1 min se protřepává. Po oddělení se použije horní vrstva.
Porovnávací roztok (a). Asi 10 mg *tokoferolacetatu alfa CRL* se rozpustí ve 2 ml *cyclohexanu R*.
Porovnávací roztok (b). Připraví se, jak je popsáno u zkoušeného roztoku (b). Namísto zkoušené látky se použije *tokoferolacetat alfa CRL*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru R* a *cyklohexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramech zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) jsou dvě skvrny: skvrna s vyšší hodnotou R_F je skvrna tokoferolacetatu alfa a odpovídá skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a); skvrna o nižší hodnotě R_F je skvrna tokoferolu alfa. Deska se pak postříká směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R*, roztoku *chloridu železitého R* (2,5 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *fenantroliniumchloridu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* (10 + 40 + + 40); na chromatogramech zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) je skvrna tokoferolu alfa zbarvena oranžově.

Zkoušky na čistotu

Absorbance *(2.2.25)*. 0,150 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml (roztok a). 20,0 ml původního roztoku se zředí na 50,0 ml *ethanolem R* (roztok b). Změří se absorbance roztoku (a) v maximu při 284 nm a absorbance roztoku (b) v minimu při 254 nm. Specifická absorbance v maximu je 42,0 až 45,0 a v minimu je 7,0 až 9,0.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Volný tokoferol. Nejvýše 1,0 %; 0,500 g se rozpustí ve 100 ml roztoku *kyseliny sírové v lihu 96% (0,25 mol/l) RS*. Přidá se 20 ml *vody R* a 0,1 ml roztoku *difenylaminu R* (2,5 g/l) v *kyselině sírové R*

a titruje se *tetrasulfatoceričitanem amonným 0,01 mol/l VS* do modrého zbarvení, které vydrží 5 s. Provede se slepá zkouška.

1 ml *tetrasulfatoceričitanu amonného 0,01 mol/l VS* odpovídá 2,154 mg volného tokoferolu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *dotriakontanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 g *dotriakontanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v 10,0 ml roztoku vnitřního standardu, zředí se *hexanem R* na 50,0 ml a promíchá se.

Porovnávací roztok. 0,100 g *tokoferolacetatu alfa CRL* se rozpustí v 10,0 ml roztoku vnitřního standardu, zředí se *hexanem R* na 50,0 ml a promíchá se.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- silanizované skleněné kolony délky 2,0 m až 3,0 m a vnitřního průměru 2,2 mm až 4,0 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* (125 μm až 150 μm nebo 150 μm až 180 μm) silanizovanou dimethyldichlorsilanem, impregnovanou 1 % až 5 % *polydimethylsiloxanu R*; na obou koncích kolony je zátka silanizované skleněné vaty,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 25 ml/min až 90 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje konstantní v rozmezí 245 °C až 280 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je v rozmezí 270 °C až 320 °C. Teplota kolony a průtoková rychlost nosného plynu se nastaví tak, aby se dosáhlo požadovaného rozlišení.

Nastřikuje se přímo do kolony nebo prostřednictvím nástřikového prostoru (přednostně vyloženého sklem) za použití automatického nastřikovacího zařízení nebo nějaké jiné reprodukovatelné nastřikovací metody. Plochy píků se měří elektronickým integrátorem.

Rozlišení. Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Postup se opakuje, až odezvový faktor (*RF*), stanovený jak je popsáno dále, je konstantní s odchylkou ±2 %. Rozlišení (R_s) je nejméně 1,4.

Zkouška na rušicí látky. 0,100 g zkoušené látky se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. Nastříkne se 1 μl a zaznamená se chromatogram. Nastaví se citlivost tak, aby výška píku tokoferolacetatu alfa byla větší než 50 % celé stupnice zapisovače. Během zaznamenávání se změní citlivost tak, aby pík se stejnou hodnotou t_R jako dotriakontan se zaznamenal s citlivostí nejméně osmkrát větší než pík tokoferolacetatu alfa. Jestliže se na registračním papíru šířky 250 mm zaznamená nějaký pík výšky alespoň 5 mm stejné hodnoty t_R jako pík dotriakontanu, použije se pro konečný výpočet korigovaná plocha píku $S'_{D(kor)}$.

$$S'_{D(kor)} = S'_D - \frac{S_I \cdot S'_T}{f \cdot S_{TI}} ,$$

v němž značí:

S'_D - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_I - plochu rušicího píku (stejné hodnoty t_R jako má vnitřní standard) na chromatogramu získaném při zkoušce na rušicí látky,

$S_T^{/}$ - plochu píku tokoferolacetatu alfa na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_{TI} - plochu píku tokoferolacetatu alfa na chromatogramu získaném při zkoušce na rušicí látky,

f - faktor vyjadřující změnu citlivosti.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku a zaznamená se chromatogram, přičemž se nastaví taková citlivost, aby pík tokoferolacetatu alfa byl větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Změří se plochy píků tokoferolacetatu alfa (S_T) a dotriakontanu (S_D) a stanoví se odezvový faktor (RF), jak je popsáno níže. Stejným způsobem se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku. Změří se plochy píků tokoferolacetatu alfa ($S_T^{/}$) a dotriakontanu ($S_D^{/}$).

Stanoví se odezvový faktor (RF) pro tokoferolacetat alfa na chromatogramu porovnávacího roztoku z plochy píku tokoferolacetatu alfa a píku dotriakontanu podle vzorce:

$$\frac{S_D \cdot m_T}{S_T \cdot m_D} .$$

Obsah tokoferolacetatu alfa v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100(S_T^{/} \cdot m_D \cdot RF)}{S_{D(kor)}^{/} \cdot m} ,$$

v němž značí:

S_D - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu porovnávacího roztoku,

$S_{D(kor)}^{/}$ - korigovanou plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_T - plochu píku *tokoferolu alfa CRL* na chromatogramu porovnávacího roztoku,

$S_T^{/}$ - plochu píku tokoferolu alfa na chromatogramu zkoušeného roztoku,

m_D - hmotnost vnitřního standardu v miligramech ve zkoušeném roztoku a v porovnávacím roztoku,

m_T - hmotnost *tokoferolu alfa CRL* v miligramech v porovnávacím roztoku,

m - hmotnost zkoušené látky v miligramech ve zkoušeném roztoku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

† Tocoferoli alfa acetatis pulvis

Tokoferolacetat alfa prášek

Synonymum. α-Tocopheroli acetatis pulvis

Je to jemná disperze tokoferolacetatu alfa připravená ve vhodném nosiči vhodné kvality (např. želatina, arabská klovatina, cukry, laktoproteiny a nebo jejich směsi) nebo získaná adsorpcí tokoferolacetatu alfa na kyselinu křemičitou vhodné kvality.

Deklarovaný obsah tokoferolacetatu alfa je nejméně 25 g na 100 g prášku. Přípravek obsahuje 90,0 % až 115,0 % deklarovaného obsahu.

Vlastnosti

Téměř bílé, nažloutlé nebo světle hnědé malé částečky, které podle způsobu přípravy mohou být prakticky nerozpustné ve vodě nebo bobtnat nebo tvořit disperzi.

Zkoušky totožnosti

Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*

Zkoušený roztok. K množství prášku odpovídajícímu 50 mg tokoferolacetatu alfa se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a vloží se do ultrazvukové lázně 60 °C teplé. Přidá se 5 ml *ethanolu R* 10 ml *cyklohexanu R*, protřepává se 1 min a 5 min se odstřeďuje. Použije se horní vrstva.

Porovnávací roztok. 50 mg *tokoferolacetatu alfa CRL* se rozpustí v *cyklohexanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru R* a *cyklohexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Stanovení obsahu

Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *dotriakontanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,20 g *dotriakontanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. Odváží se přesně množství zkoušené látky odpovídající přibližně 0,100 g *tokoferolacetatu alfa* do 250ml kuželové baňky. Přidá se 20 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a vloží se na 20 min do ultrazvukové lázně 70 °C teplé. Potom se přidá 50 ml *ethanolu R* a 50,0 ml roztoku vnitřního standardu a důkladně se míchá 30 min. Po oddělení fází se použije horní vrstva.

Porovnávací roztok. 0,100 g *tokoferolacetatu alfa CRL* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- silanizované skleněné kolony délky 2,0 m až 3,0 m a vnitřního průměru 2,2 mm až 4,0 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* (125 μm až 150 μm nebo 150 μm až 180 μm) silanizovanou dimethyldichlorsilanem, impregnovanou 1 % až 5 % *polydimethylsiloxanu R;* na obou koncích kolony je zátka silanizované skleněné vaty,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 25 ml/min až 90 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje konstantní v rozmezí 245 °C až 280 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je v rozmezí 270 °C až 320 °C. Teplota kolony a průtoková rychlost nosného plynu se nastaví tak, aby se dosáhlo požadovaného rozlišení.

Nastřikuje se přímo do kolony nebo prostřednictvím nástřikového prostoru (přednostně vyloženého sklem) za použití automatického nastřikovacího zařízení nebo nějaké jiné reprodukovatelné nastřikovací metody. Plochy píků se měří elektronickým integrátorem.

Rozlišení. Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Postup se opakuje, až odezvový faktor (*RF*), stanovený, jak je popsáno dále, je konstantní s odchylkou ±2 %. Rozlišení (R_s) mezi píkem dotriakontanu a píkem tokoferolacetatu alfa je nejméně 1,4.

Zkouška na rušicí látky. Odváží se přesně množství zkoušené látky odpovídající přibližně 0,100 g tokoferolacetatu alfa do 250ml kuželové baňky. Přidá se 20 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a vloží se na 20 min do ultrazvukové lázně 70 °C teplé. Potom se přidá 50 ml *ethanolu R*, 50 ml *hexanu R* a 30 min se důkladně míchá. Po oddělení vrstvy se nastříkne 1 μl horní vrstvy a zaznamená se chromatogram. Nastaví se citlivost tak, aby výška píku tokoferolacetatu alfa byla větší než 50 % celé stupnice zapisovače. Během zaznamenávání se změní citlivost tak, aby pík se stejnou hodnotou t_R jako dotriakontan se zaznamenal s citlivostí nejméně osmkrát větší než pík tokoferolacetatu alfa. Jestliže se na registračním papíru šířky 250 mm zaznamená nějaký pík výšky alespoň 5 mm stejné hodnoty t_R jako pík dotriakontanu, použije se pro konečný výpočet korigovaná plocha píku $S'_{D(kor)}$ podle vzorce:

$$S'_{D(kor)} = S'_D - \frac{S_I \cdot S'_T}{f \cdot S_{TI}} ,$$

v němž značí:

S'_D - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_I - plochu rušicího píku (stejné hodnoty t_R jako má vnitřní standard) na chromatogramu získaném při zkoušce na rušicí látky,

S'_T - plochu píku tokoferolacetatu alfa na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_{TI} - plochu píku tokoferolacetatu alfa na chromatogramu získaném při zkoušce na rušicí látky,

f - faktor vyjadřující změnu citlivosti.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku a zaznamená se chromatogram, přičemž se nastaví taková citlivost, aby pík tokoferolacetatu alfa byl větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Změří se plochy píků tokoferolacetatu alfa (S_T) a dotriakontanu (S_D) a stanoví se odezvový faktor (*RF*), jak je popsáno níže. Stejným způsobem se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku. Změří se plochy píků tokoferolacetatu alfa (S'_T) a dotriakontanu (S'_D).

Stanoví se odezvový faktor (*RF*) pro tokoferolacetat alfa na chromatogramu porovnávacího roztoku z plochy píku tokoferolacetatu alfa a píku dotriakontanu podle vzorce:

$$\frac{S_D \cdot m_T}{S_T \cdot m_D} .$$

Obsah tokoferolacetatu alfa v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100(S'_T \cdot m_D \cdot RF)}{S'_{D(kor)} \cdot m} ,$$

v němž značí:

S_D - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu porovnávacího roztoku,

$S'_{D(kor)}$ - korigovanou plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_T - plochu píku *tokoferolu alfa CRL* na chromatogramu porovnávacího roztoku,

S'_T - plochu píku tokoferolu alfa na chromatogramu zkoušeného roztoku,

m_D - hmotnost vnitřního standardu v miligramech ve zkoušeném roztoku a v porovnávacím roztoku,

m_T - hmotnost *tokoferolu alfa CRL* v miligramech v porovnávacím roztoku,

m - hmotnost zkoušené látky v miligramech ve zkoušeném roztoku.

Uchovávání

V dobře uzavřených, zcela naplněných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

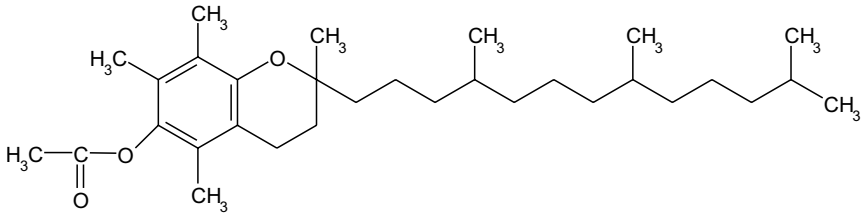
Označování

V označení na obalu se uvede obsah tokoferolacetatu alfa v gramech na 100 g prášku.

† Tocoferolum alfa

Tokoferol alfa

Synonyma. α-Tocopherolum, Tocoferolum



$C_{29}H_{50}O_2$ M_r 430,71 CAS 10191-41-0

Je to 5,7,8-trimethyltokol. Obsahuje 96,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{29}H_{50}O_2$.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo žlutohnědá viskózní olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v ethanolu, v etheru, v dichlormethanu a v mastných olejích.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Absorbance, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky je shodné se spektrem *tokoferolu alfa CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu HF_{254} R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí ve 2 ml *cyklohexanu R.*
Porovnávací roztok. 10 mg *tokoferolu alfa CRL* se rozpustí ve 2 ml *cyclohexanu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 μl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *etheru R* a *cyclohexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. Vrstva se postříká směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R*, roztoku *chloridu železitého R* (2,5 g/l) v *lihu 96% R* a roztoku *fenantroliniumchloridu R* (10 g/l) v *lihu 96% R* (10 + 40 + + 40). Po 1 h až 2 h se hlavní skvrny zbarví oranžově.

Zkoušky na čistotu

Absorbance *(2.2.25)*. 0,100 g se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml (roztok a). 10,0 ml roztoku (a) se zředí *ethanolem R* na 100,0 ml (roztok b). Měří se absorbance roztoku (b) v maximu při 292 nm a roztoku (a) v minimu při 255 nm. Specifická absorbance v maximu je 72,0 až 76,0 a v minimu je 6,0 až 8,0.

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 0,50 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky. Použije se *kyselina sírová R* namísto *kyseliny sírové zředěné RS*.

Stanovení obsahu

Stanoví se plynovou chromatografií *(2.2.28)* za použití *dotriakontanu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,20 g *dotriakontanu R* se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,100 g *tokoferolu alfa CRL* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- silanizované skleněné kolony délky 2,0 m až 3,0 m a vnitřního průměru 2,2 mm až 4,0 mm naplněné *křemelinou pro plynovou chromatografii R* (125 μm až 150 μm nebo 150 μm až 180 μm) silanizovanou dimethyldichlorsilanem, impregnovanou 1 % až 5 % *polydimethylsiloxanu R;* na obou koncích kolony je zátka silanizované skleněné vaty,
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 25 ml/min až 90 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje konstantní v rozmezí 245 °C až 280 °C, teplota nástřikového prostoru a detektoru je v rozmezí 270 °C až 320 °C. Teplota kolony a průtoková rychlost nosného plynu se nastaví tak, aby se dosáhlo požadovaného rozlišení.

Nastřikuje se přímo do kolony nebo prostřednictvím nástřikového prostoru (přednostně vyloženého sklem) za použití automatického nastřikovacího zařízení nebo nějaké jiné reprodukovatelné nastřikovací metody. Plochy píků se měří elektronickým integrátorem.

Rozlišení. Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku. Postup se opakuje, až odezvový faktor (RF), stanovený, jak je popsáno dále, je konstantní s odchylkou ±2 %. Rozlišení (R_s) mezi píkem dotriakontanu a tokoferolu alfa je nejméně 2,6.

Zkouška na rušicí látky. 0,100 g zkoušené látky se rozpustí v *hexanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. Nastříkne se 1 μl a zaznamená se chromatogram. Nastaví se citlivost tak, aby výška píku tokoferolu alfa byla větší než 50 % celé stupnice zapisovače. Během zaznamenávání se změní citlivost tak, aby pík se stejnou hodnotou t_R jako dotriakontan se zaznamenal s citlivostí nejméně osmkrát větší než pík tokoferolu alfa. Jestliže se na registračním papíru šířky 250 mm zaznamená nějaký pík výšky alespoň 5 mm stejné hodnoty t_R jako pík dotriakontanu, použije se pro konečný výpočet korigovaná plocha píku $S'_{D(kor)}$ podle vzorce:

$$S'_{D(kor)} = S'_D - \frac{S_I \cdot S'_T}{f \cdot S_{TI}},$$

v němž značí:

S'_D - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_I - plochu rušicího píku (stejné hodnoty t_R jako má vnitřní standard) na chromatogramu získaném při zkoušce na rušicí látky,

S'_T - plochu píku tokoferolu alfa na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_{TI} - plochu píku tokoferolu alfa na chromatogramu získaném při zkoušce na rušicí látky,

f - faktor vyjadřující změnu citlivosti.

Nastříkne se 1 μl porovnávacího roztoku a zaznamená se chromatogram, přičemž se nastaví taková citlivost, aby pík tokoferolu alfa byl větší než 50 % rozsahu stupnice zapisovače. Změří se plochy píků tokoferolu alfa (S_T) a dotriakontanu (S_D) a stanoví se odezvový faktor (RF), jak je popsáno níže. Stejným způsobem se nastříkne 1 μl zkoušeného roztoku. Změří se plochy píků tokoferolu alfa ($2S'_T$) a dotriakontanu (S'_D).

Stanoví se odezvový faktor (*RF*) pro tokoferol alfa na chromatogramu porovnávacího roztoku z plochy píku tokoferolu alfa a píku dotriakontanu podle vzorce:

$$\frac{S_D \cdot m_T}{S_T \cdot m_D}.$$

Obsah tokoferolu alfa v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{100(S'_T \cdot m_D \cdot RF)}{S'_{D(kor)} \cdot m},$$

v němž značí:

S_D - plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu porovnávacího roztoku,

$S'_{D(kor)}$ - korigovanou plochu píku vnitřního standardu na chromatogramu zkoušeného roztoku,

S_T - plochu píku *tokoferolu alfa CRL* na chromatogramu porovnávacího roztoku,

S'_T - plochu píku tokoferolu alfa na chromatogramu zkoušeného roztoku,

m_D - hmotnost vnitřního standardu v miligramech ve zkoušeném roztoku a v porovnávacím roztoku,

m_T - hmotnost *tokoferolu alfa CRL* v miligramech v porovnávacím roztoku,

m - hmotnost zkoušené látky v miligramech ve zkoušeném roztoku.

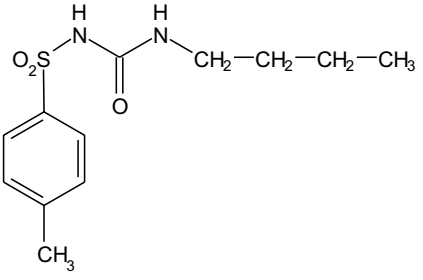
Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech pod inertním plynem, chráněn před světlem.

Separandum.

† Tolbutamidum

Tolbutamid



$C_{12}H_{18}N_2O_3S$ M_r 270,35 CAS 64-77-7

Je to 1-butyl-3-[(4-tolyl)sulfonyl]močovina. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{18}N_2O_3S$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a v lihu 96%, těžce rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 126 °C až 130 °C.

B. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 245 nm až 300 nm. Roztok vykazuje tři absorpční maxima: při 258 nm, 263 nm, 275 nm, a prodlevu při 268 nm. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 250,0 ml a změří se absorbance při 220 nm až 235 nm; roztok vykazuje jedno absorpční maximum při 228 nm. Specifická absorbance v maximu je 480 až 520.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *tolbutamidu CRL.*

D. K 0,2 g se přidá 8 ml roztoku *kyseliny sírové R* (500 g/l), 30 min se zahřívá pod zpětným chladičem a nechá se ochladit. Vyloučené krystaly se rekrystalizují z horké *vody R* a suší při 100 °C až 105 °C; teplota tání (*2.2.14*) je 135 °C až 140 °C.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,2 g se rozpustí v 5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a přidá se 5 ml *vody R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 5,5. Měří se následující roztok: k 2,0 g se přidá 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*, 5 min se zahřívá při 70 °C, pak se prudce ochladí a zfiltruje.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,50 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 15 mg *toluensulfonamidu R* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). K 5 ml zkoušeného roztoku se přidá 5 ml porovnávacího roztoku (a).

Na vrstvu se nanese odděleně 5 µl zkoušeného roztoku, 5 µl porovnávacího roztoku (a) a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (2 + 8 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a 10 min se zahřívá při 110 °C. Na dno chromatografické komory se umístí odpařovací miska obsahující roztok *manganistanu draselného R* (50 g/l) a přidá se stejné množství *kyseliny chlorovodíkové R.* Ještě horká vrstva se vloží do komory nasycené parami chloru a komora se opět uzavře. Po 2 min se vrstva vyjme a vystaví se působení proudu studeného vzduchu tak dlouho, až je chlor odstraněn a až část vrstvy pod startem reaguje s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS* za vzniku alespoň slabě modrého zbarvení; působení studeného vzduchu se nemá prodlužovat. Vrstva se postříká *škrobem s jodidem draselným RS* a nechá se 5 min stát; na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85) a zředí se na 20 ml stejnou směsí rozpouštědel. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce B na těžké kovy (20 µg/g). Porovnávací roztok (1 µg Pb/ml) se připraví zředěním základního *roztoku olova (100 µg Pb/ml)* směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (15 + 85).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,2500 g se rozpustí ve směsi obsahující 20 ml *vody R* a 40 ml *lihu 96% R.* Titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *fenolftaleinu RS* jako indikátoru.

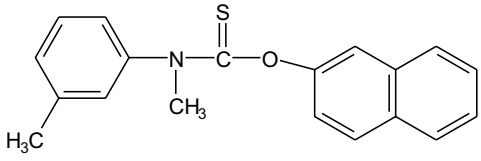
1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 27,03 mg sloučeniny $C_{12}H_{18}N_2O_3S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Tolnaftatum

Tolnaftat



$C_{19}H_{17}NOS$ M_r 307,41 CAS 2398-96-1

Je to O-(2-naftyl)-N-methyl-N-(3-methylfenyl)thiokarbamat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{19}H_{17}NOS$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu a v dichlormethanu, mírně rozpustný v etheru, velmi těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 109 °C až 112 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tolnaftatu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 1 mg se smíchá s 0,5 ml *kyseliny sírové R* a přidá se 0,05 ml *formaldehydu R;* vzniká zelenomodré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v 10 ml *acetonu R.* Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 2 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *tolnaftatu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 50 mg *2-naftolu R* se rozpustí v 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se *toluenem R* po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu

zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 3 h v sušárně při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

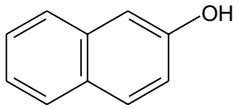
50,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 250,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku v maximu při 257 nm.

Vypočítá se obsah $C_{19}H_{17}NOS$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 720.

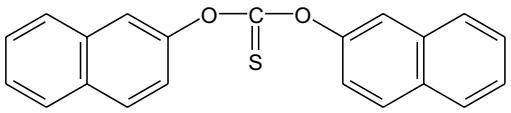
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

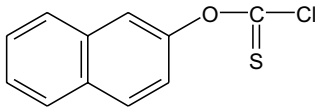
Nečistoty



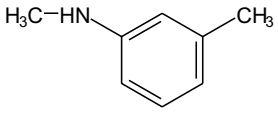
A. 2-naftol,



B. O,O-di(2-naftyl)thiokarbonat,



C. O-(2-naftyl)chlorthioformat,



D. N-methyl-N-(3-methylfenyl)amin.

Tormentillae radix

N

Nátržníkový kořen

Synonymum. Radix tormentillae

Je to usušený, kořenů zbavený oddenek druhu *Potentilla erecta* (L.) RÄUSCH. (*syn: Potentilla tormentilla* STOKES). Obsahuje nejméně 1,5 % tříslovin.

Vlastnosti

Droga téměř bez pachu, chuti silně svíravé.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Oddenek válcovitý, vřetenovitý nebo hlízovitý, přímý nebo zakřivený, až 10 cm dlouhý a většinou 1 cm až 2 cm silný, velmi tvrdý, jen velmi obtížně lámavý. Povrch oddenku hnědý až červenohnědý, svraskalý, se zbytky kořenů a hlubokými příčnými jizvami po stoncích. Oddenek je často mnohohlavý; někdy se zbytky stonku. Lom je tmavočervený až hnědočervený, protkaný bělavými zdřevnatělými cévními svazky, lesklý, rohovitý, křehký, nerovný.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je červenohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: hrubě ostnité drúzy šťavelanu vápenatého o průměru 60 μm; úlomky parenchymu s buňkami obsahujícími červenohnědou hmotu; skupiny a úlomky cév; skupiny a úlomky sklerenchymatických vláken; někdy úlomky korku s deskovitými, hnědými, tenkostěnnými buňkami; nepravidelná škrobová zrna o průměru až 30 μm.

C. 0,3 g práškované drogy (355) se protřepává 5 min se 3 ml *methanolu R* a pak se zfiltruje. 0,1 ml červeně zbarveného filtrátu se zředí 3 ml *vody R* a smíchá se s 0,1 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne zelené zbarvení.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se protřepává 10 min s 10 ml *vody R* a pak se zfiltruje. Filtrát se protřepává dvakrát 10 ml *ethylacetatu R.* Spojené horní vrstvy se zfiltrují přes 6 g *síranu sodného bezvodého R.* Filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v 1,0 ml *ethylacetatu R.*
Porovnávací roztok. 1,0 mg *katechinu R* se rozpustí v 1,0 ml *methanolu R.*

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *etheru R*, *hexanu R* a *ethylacetatu R* (20 + 20 + 20 + 40) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 10 min až 15 min na vzduchu a pak se postříká čerstvě připraveným roztokem *modři pravé B R* (5 g/l). Jsou patrné červené skvrny. Vrstva se vystaví působení par amoniaku. Skvrny se zbarví intenzivně červenohnědě. Vrstva se pozoruje v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části intenzivní červenohnědá skvrna cianidanolu (katechin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku hlavní skvrna odpovídá polohou a zbarvením skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku, intenzitou jí však převyšuje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohu být patrné další, méně intenzivní skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 % kořenů a stonků, nejvýše 3 % oddenků na lomu zčernalých a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 5,0 %.

Stanovení obsahu

0,750 g práškované drogy (180) se v kuželové baňce smíchá se 150 ml *vody R*. Ve vodní lázni pod zpětným chladičem se zahřeje k varu, při kterém se udržuje 30 min. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede do odměrné baňky a zředí se *vodou R* na 250,0 ml. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje filtračním papírem o průměru 12 cm. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Celkový zbytek. 25,0 ml filtrátu se v předem zvážené 50ml kádince odpaří do sucha při 90 °C. Po 60 min se zváží.

Zbytek po použití kožního prášku. 100,0 ml filtrátu se smíchá s 1,000 g *kožního prášku CRL* a protřepává se intenzivně 60 min. Pak se zfiltruje. 25,0 ml filtrátu se v předem zvážené 50ml kádince odpaří do sucha při 90 °C. Po 60 min se zváží.

Porovnávací roztok. 1,000 g *kožního prášku CRL* se protřepává intenzivně 60 min se 100,0 ml *vody R.* Pak se zfiltruje. 25,0 ml filtrátu se v předem zvážené kádince na 50 ml odpaří do sucha při 90 °C. Po 60 min se zváží.

Zkoušky se opakují třikrát, stanoví se průměrné hodnoty.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{R_1 - R_2 + R_0 \,.\, 100}{m},$$

v němž značí:

R_1 - průměrnou hmotnost celkového zbytku v gramech,
R_2 - průměrnou hmotnost po použití kožního prášku v gramech,
R_0 - průměrnou hmotnost zbytku porovnávacího roztoku v gramech,
m - navážku drogy v gramech.

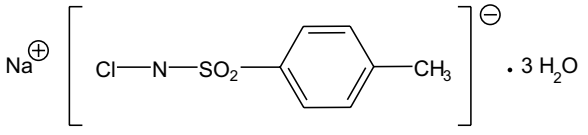
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Tosylchloramidum natricum

Sodná sůl tosylchloramidu

Synonymum. Chloraminum



$C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$ M_r 281,69 CAS 7080-50-4

Je to trihydrát sodné soli N-chlor-4-methylbenzensulfonamidu. Obsahuje 98,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$.

Vlastnosti

Bílý nebo světle žlutý krystalický prášek. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, barví *papír lakmusový červený R* modře, ale zbarvení je nestálé.

B. K 10 ml roztoku S se přidá 10 ml *peroxidu vodíku zředěného RS;* vznikne bílá sraženina, která se zahřátím rozpouští. Horký roztok se zfiltruje a nechá se ochladit, vyloučené bílé krystaly se promyjí a suší při 100 C až 105 C; teplota tání (*2.2.14*) je 137 C až 140 C.

C. Žíhá se 1 g (opatrně, neboť hrozí nebezpečí náhlého vznícení). Zbytek se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

D. Roztok připravený ve zkoušce C vyhovuje zkoušce (a) na sírany (*2.3.1*).

E. Roztok připravený ve zkoušce C vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 8,0 až 10,0; měří se roztok S.

Orthoderiváty. Ke 2 g se přidá 10 ml *vody R*, promíchá se, přidá se 1 g *disiřičitanu sodného R* a zahřívá se k varu. Ochladí se na 0 C, rychle se zfiltruje a promyje se třikrát vždy 5 ml ledové *vody R*. Sraženina se suší nad *oxidem fosforečným R* a za tlaku nepřevyšujícího 600 Pa; taje při teplotě nejméně 134 C (*2.2.14*).

Látky nerozpustné v ethanolu. 1,00 g se 30 min protřepává s 20 ml *ethanolu R*, zfiltruje se přes zvážený filtr, zbytek se promyje 5 ml *ethanolu R* a suší se při 100 C až 105 C. Zbytek váží nejvýše 20 mg (2 %).

Stanovení obsahu

0,125 g se rozpustí v baňce se zabroušenou zátkou ve 100 ml *vody R*, přidá se 1 g *jodidu draselného R* a 5 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a nechá se 3 min stát. Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití 1 ml *škrobu RS* jako indikátoru.

1 ml *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 14,08 mg $C_7H_7ClNNaO_2S$. 3 H_2O.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C.
Separandum.

Tragacantha

Tragant

CAS 9000-65-1

Je to na vzduchu ztvrdlý sliz vytékající samovolně nebo po naříznutí kmenu a větví druhu *Astragalus gummifer* Labill. a některých dalších druhů *Astragalus* ze západní Asie.

Vlastnosti

Droga téměř bez chuti. Tenké, zploštělé, pentlicovité, bílé až nažloutlé proužky, asi 30 mm dlouhé, 10 mm široké a až 1 mm silné, více nebo méně zakřivené; průsvitné, rohovité; lom krátký; na povrchu jemné, podélné rýhy a soustředná, příčná žebra. Mohou být přítomny poněkud silnější kusy podobného tvaru, méně průsvitné a těžko se lámající.

Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

A. Droga se upráškuje (355). Prášek je bílý nebo téměř bílý, s desetinásobným množstvím *vody R* tvoří slizový gel. Pozoruje se pod mikroskopem v *glycerolu R* 50% *(V/V)*. V gumovité hmotě jsou patrny četné vrstevnaté buněčné membrány, které se barví *chloridem zinečnatým s jodem RS* fialově. Škrobová zrna jednotlivá nebo v malých skupinách, většinou okrouhlá, někdy deformovaná, o průměru 4 μm až 10 μm, příležitostně až 20 μm; centrální štěrbina je viditelná v polarizovaném světle.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *křemeliny G R*. K přípravě vrstvy se použije místo *vody R* roztok *dihydrogenfosforečnanu sodného R* (16 g/l).

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (355) se smíchá s 25 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (4 + 96) a zahřívá se 90 min pod zpětným chladičem ve vodní lázni. Po ochlazení se 10 ml roztoku neutralizuje asi 3 g *uhličitanu barnatého R;* protřepává se asi 90 min a pak se zfiltruje. 1 ml filtrátu se zředí 9 ml *methanolu R* a odstřeďuje se.

Porovnávací roztok. 10 mg *arabinosy R*, 10 mg *fukosy R*, 10 mg *galaktosy R* a 10 mg *xylosy R* se rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného R* (16 g/l), *1-butanolu R* a *acetonu R* (10 + 40 + 50) po dráze 10 cm. Vrstva se suší několik minut v proudu horkého vzduchu a vyvíjí se stejnou mobilní fází ještě jednou po dráze 15 cm. Potom se suší 10 min při 110 °C, postříká se *zkoumadlem aminohippurovým R* a suší se 10 min při 110 °C. Na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny ve formě pruhů (v pořadí vzrůstajícího R_F) odpovídající galaktose (žlutohnědá), arabinose (červenohnědá), xylose (červená) a fukose (žlutá). Čtyři skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku; na čele chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna nažloutlá skvrna, mezi skvrnami galaktosy a arabinosy je patrna žlutá skvrna.

C. 0,5 g práškované drogy (355) se navlhčí 1 ml *lihu 96% R* a postupně, za stálého protřepávání se smíchá s 50 ml *vody R*, dokud nevznikne homogenní sliz. 5 ml slizu se smíchá s 5 ml *vody R* a 2 ml *hydroxidu barnatého RS;* vznikne jemná vločkovitá sraženina. Zahřívá se 10 min na vodní lázni; vzniká intenzivně žluté zbarvení.

D. 4 ml disperze zkoušené látky (5 g/l) ve *vodě R* se smíchá s 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Smíchá se se 3 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a 2 ml *vínanu měďnatého RS* a zahřívá se na vodní lázni. Vznikne červenohnědá sraženina, barva roztoku se mění na světle modrou nebo ve žlutou.

Zkoušky na čistotu

Methylcelulosa. Hodnotí se chromatogramy ze Zkoušky totožnosti B. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není patrna v blízkosti čela chromatogramu červená skvrna.

Arabská klovatina a jiné rozpustné klovatiny. 50 mg práškované drogy (355) se disperguje ve 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a smíchá se s 10 ml *octanu olovnatého RS;* vznikne vločkovitá sraženina. Odstřeďuje se tak dlouho, dokud nevznikne čirá supernatantní tekutina. 10 ml supernatantní tekutiny se smíchá s 10 ml *octanu olovnatého zásaditého RS*. Roztok se může lehce kalit, nevzniká však sraženina.

Slizy z rostlin rodu *Sterculia*.

A. 0,2 g práškované drogy (355) se v odměrném válci na 10 ml se zábrusem děleném po 0,1 ml protřepává s 10 ml *lihu R* 60% *(V/V)*. Objem slizu je nejvýše 1,5 ml.

B. 1,0 g práškované drogy (355) se protřepává se 100 ml *vody R* a pak se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Barva roztoku se změní po přidání nejvýše 5,0 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Cizí látky. 2,0 g práškované drogy (355) se v baňce na 250 ml smíchá s 95 ml *methanolu R*. Navlhčený prášek se promíchá a přidá se 60 ml *kyseliny chlorovodíkové RS*. Přidá se několik skleněných varných kuliček o průměru asi 4 mm a zahřívá se 3 h pod zpětným chladičem ve vodní lázni za občasného protřepávání. Varné kuličky se odstraní a ještě horká suspenze se zfiltruje za sníženého tlaku filtrem ze slinutého skla (160). Baňka a filtr se promyjí malým množstvím *vody R* a potom asi 40 ml *methanolu R* a suší se (asi 1 h) při 110 °C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Zbytek váží nejvýše 20 mg (1,0 %).

Průtokový čas. Nejméně 10 s, je-li látka určena pro přípravu emulzí nejméně 50 s. 1,0 g práškované drogy (125 až 250) se v baňce na 1000 ml se zábrusem smíchá s 8,0 ml *lihu 96% R* a baňka se uzavře. Promíchá se tak, aby suspenze pokryla vnitřní stěny baňky, ale aby nesmáčela

zátku. Pak se přidá 72,0 ml *vody R*, baňka se uzavře a intenzivně se protřepává 3 min. Po 24 h stání se znovu intenzivně protřepává 3 min. Vzduchové bubliny se odstraní ze slizu za sníženého tlaku (5 min). Sliz se převede do válce na 50 ml. Do slizu se ponoří skleněná trubice délky 200 mm a vnitřního průměru 6,0 mm označená ve vzdálenosti 20 mm a 120 mm od spodního okraje. Trubice nesmí být umyta povrchově aktivními látkami. Když dosáhne hladina slizu horní značky, uzavře se trubice prstem. Pak se vyjme z válce, prst se odstraní a měří se stopkami čas v sekundách potřebný k tomu, aby hladina slizu dosáhla spodní značky. Opakuje se čtyřikrát, vypočítá se průměrná hodnota posledních tří stanovení.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 4,0 %.

Mikrobiální znečištění Nejvýše 10^4 nepatogenních mikroorganismů v 1 g; stanoví se plotnovou metodou (*2.6.12*). Vyhovuje zkoušce (*2.6.13*) na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella.*

Uchovávání

Chráněn před světlem a vlhkostí.

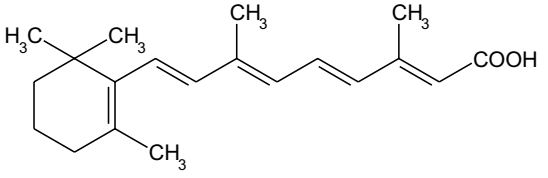
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka vhodná pro přípravu emulzí.

---

† Tretinoinum

Tretinoin



$C_{20}H_{28}O_2$ M_r 300,44 CAS 302-79-4

Je to kyselina all-*trans*-retinoová, tj. kyselina (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1--cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{20}H_{28}O_2$.

Vlastnosti

Žlutý nebo světle oranžový krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v etheru, těžce rozpustný v lihu 96%. Vlivem tepla, světla a vzduchu se rozkládá, zejména v roztoku.

Taje při asi 182 °C, za rozkladu.

Všechny postupy se provádějí co nejrychleji a za ochrany před světlem; použijí se čerstvě připravené roztoky.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 75,0 mg se rozpustí v 5 ml *chloroformu R* a ihned se zředí na 100,0 ml okyseleným *2-propanolem R* (připraví se zředěním 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS 2-propanolem R* na 1000 ml). 5,0 ml tohoto roztoku se zředí okyseleným *2-propanolem R* na 100,0 ml a 5,0 ml takto zředěného roztoku se dále zředí stejným rozpouštědlem na 50,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* tohoto roztoku při 300 až 400 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 353 nm. Specifická absorbance v maximu je 1455 až 1545.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tretinoinu CRL*.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *tretinoinu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *acetonu R*, *etheru prostého peroxidických látek R* a *cyklohexanu R* (2 + 4 + 40 + 54) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se shoduje polohou a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Asi 5 mg se rozpustí v 2 ml *chloridu antimonitého RS;* vznikne intenzivní červené zbarvení, které se později změní na fialové.

Zkoušky na čistotu

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *isotretinoinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se smíchá s 0,5 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,2 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (10 μm),
- mobilní fáze, kterou je roztok *kyseliny octové ledové R* 0,5% *(V/V)* ve směsi objemových dílů *methanolu R* a *vody R* v takovém poměru, aby retenční čas tretinoinu byl asi 15 min (obvykle 77 + 23). Průtoková rychlost je 1,4 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 353 nm.

Odděleně se nastříkne po 10 μl každého z porovnávacích roztoků (b), (c) a (d) a zkoušeného roztoku. Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výška hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 70 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky isotretinoinu a tretinoinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je nejméně 2,0. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího isotretinoinu není větší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2,0 %); součet

ploch všech píků, kromě hlavního píku, píku rozpouštědla a píku isotretinoinu, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,5 %).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 0,5 g vyhovuje limitní zkoušce (d) na těžké kovy. K přípravě porovnávacího roztoku se použije 1 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 70 ml *acetonu R* a titruje se *tetrabutylamoniumhydroxidem 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *tetrabutylamoniumhydroxidu 0,1 mol/l VS* odpovídá 30,04 mg $C_{20}H_{28}O_2$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C. Doporučuje se chránit zbylý obsah otevřeného použitého obalu, jak je to možné, v atmosféře inertního plynu.

Separandum.

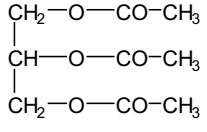
Nečistoty

A. isotretinoin,
B. kyselina (2*Z*,4*E*,6*Z*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová (kyselina 9,13-di-*cis*-retinoová),
C. kyselina (2*Z*,4*Z*,6*E*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová (kyselina 11,13-di-*cis*-retinoová),
D. kyselina (2*E*,4*E*,6*Z*,8*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraenová (kyselina 9-*cis*-retinoová),
E. oxidační produkty tretinoinu.

Triacetinum

Triacetin

Synonyma. Glyceroli triacetas, Glycerolum triacetas



$C_9H_{14}O_6$ M_r 218,21 CAS 102-76-1

Je to 1,2,3-propantriyltriacetat. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_9H_{14}O_6$.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá slabě viskózní olejovitá kapalina. Je dobře rozpustný ve vodě, mísitelný s ethanolem a s toluenem.

Teplota varu je asi 260 °C.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s referenčním spektrem *Ph. Eur. triacetinu*.

Látka se zkouší ve formě filmu na *bromidu draselném R*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá *(2.2.1)* a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele reagující látky. 5,00 g se rozpustí v 25 ml *ethanolu R* předem zneutralizovaného za použití 0,2 ml *fenolftaleinu RS* a přidá se 0,20 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS;* růžové zbarvení směsi je stálé 15 s.

Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,159 až 1,164.

Index lomu *(2.2.6)*. 1,429 až 1,432.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 5,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se převede do 250ml baňky z borosilikátového skla, přidá se 25,0 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* a několik varných kuliček. Zahřívá se 30 min pod zpětným chladičem. Pak se přidá 1 ml *fenolftaleinu RS1* a ihned se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l VS.* Provede se slepá zkouška.

Obsah se vypočítá z rozdílu spotřeb hydroxidu draselného v lihu při vlastním stanovení a při slepé zkoušce.

1 ml *hydroxidu draselného v lihu 0,5 mol/l VS* odpovídá 36,37 mg $C_9H_{14}O_6$.

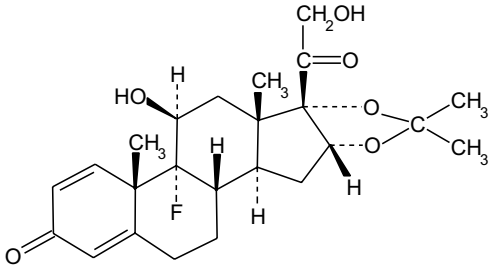
Uchovávání

V dobře uzavřených, zcela naplněných obalech.

† Triamcinoloni acetonidum

1998

Triamcinolonacetonid



$C_{24}H_{31}FO_6$ M_r 434,50 CAS 76-25-

Je to 9-fluor-11β,21-dihydroxy-16α,17-isopropylidendioxy-1,4-pregnadien-3,20-dion. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{24}H_{31}FO_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v etheru.

Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *triamcinolonacetonidu CRL.* Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka i referenční látka v minimálním množství *methanolu R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Za použití zbytků po odpaření se připraví tablety halogenové soli nebo emulze v *parafinu tekutém R* a zaznamenají se nová spektra.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm. *Roztoky se připraví těsně před použitím a chrání se před světlem. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle ihned po vyvíjení.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *triamcinolonacetonidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *triamcinolonhexacetonidu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a ihned se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího

roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm. *Roztoky se připraví těsně před použitím a chrání se před světlem. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle ihned po vyvíjení.*

Zkoušený roztok (a). 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). V dělicí nálevce se rozpustí 10 mg zkoušené látky v 1,5 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 0,5 ml roztoku *oxidu chromového R* (20 g/l) a nechá se 30 min stát. Pak se přidá 5 ml *vody R* a 2 ml *dichlormethanu R* a intenzivně se 2 min protřepává. Nechá se rozdělit a použije se spodní vrstva.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *triamcinolonacetonidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). V dělicí nálevce se rozpustí 10 mg *triamcinolonacetonidu CRL* v 1,5 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 0,5 ml roztoku *oxidu chromového R* (20 g/l) a nechá se 60 min stát. Pak se přidá 5 ml *vody R* a 2 ml *dichlormethanu R* a intenzivně se 2 min protřepává. Nechá se rozdělit a použije se spodní vrstva.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a ihned se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna každého z chromatogramů zkoušených roztoků se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu odpovídajícího roztoku. Hlavní skvrny na chromatogramech zkoušeného roztoku (b) a porovnávacího roztoku (b) mají R_F zřetelně vyšší než hlavní skvrny na chromatogramech zkoušeného roztoku (a) a porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 5 mg se smíchá se 45 mg *oxidu hořečnatého těžkého R* a žíhá se v kelímku do získání téměř bílého zbytku (obvykle méně než 5 min). Nechá se vychladnout, přidá se 1 ml *vody R*, 0,05 ml *fenolftaleinu RS1* a asi 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* tak, aby roztok zůstal bezbarvý. Zfiltruje se a 1,0 ml filtrátu se přidá k čerstvě připravené směsi 0,1 ml *alizarinu S RS* a 0,1 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS*. Promíchá se, nechá se stát 5 min. Současně se stejným způsobem provede slepá zkouška. Roztok se zkoušenou látkou je zbarven žlutě, roztok získaný při slepé zkoušce je červený.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +100° až +107°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v *dioxanu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29). Zkouška se provede za chránění před světlem.*

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v 7 ml *methanolu R* a zředí se *vodou R* na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *triamcinolonacetonidu CRL* a 2 mg *triamcinolonu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),

- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min, která je směsí připravenou takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 525 ml *methanolu R* se 400 ml *vody R*, nechá se ustálit a pak se doplní *vodou R* po značku a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 10 min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: triamcinolonu asi 5 min, triamcinolonacetonidu asi 17 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky triamcinolonu a triamcinolonacetonidu je nejméně 15. V případě potřeby se upraví koncentrace methanolu v mobilní fázi.

Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající 3,5násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než 0,25násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,25 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Zkouška se provede za chránění před světlem.

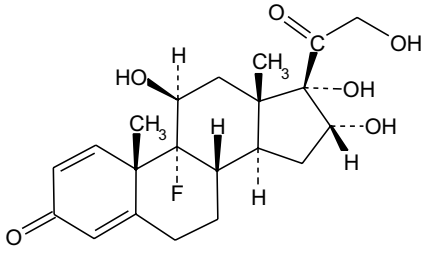
50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Změří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 238,5 nm a vypočítá se obsah $C_{24}H_{31}FO_6$ za použití specifické absorbance, která má hodnotu 355.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Nečistoty

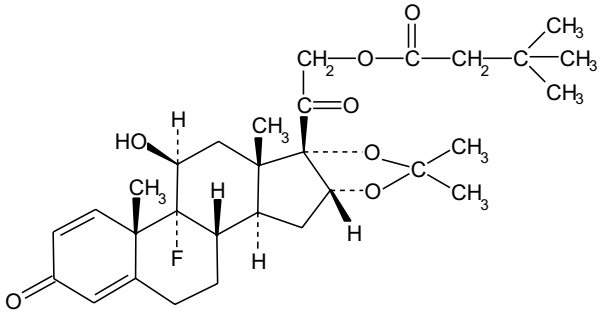


A. triamciolon.

† Triamcinoloni hexacetonidum

1998

Triamcinolonhexacetonid



$C_{30}H_{41}FO_7$ M_r 532,65 CAS 5611-51-8

Je to 9-fluor-11ß,21-dihydroxy-16α,17-isopropylidendioxy-1,4-pregnadien-3,20-dion-21-(3,3--dimethylbutanoat). Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 % sloučeniny $C_{30}H_{41}FO_7$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu a v methanolu.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *triamcinolonhexacetonidu CRL.*

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm. *Roztoky se připraví těsně před použitím a chrání se před světlem. Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle ihned po vybíjení.*

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *triamcinolonhexacetonidu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *triamcinolonacetonidu CRL* se rozpustí v porovnávacím roztoku (a) a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku. Vyvíjí se mobilní fází připravenou přidáním směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (1,2 + 8) ke směsi objemových dílů *etheru R* a *dichlormethanu R* (15 + 77) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a ihned se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou dvě zřetelně od sebe oddělené skvrny.

Zkoušky na čistotu

Specifická optická otáčivost (*2.2.7*). +92° až +98°, počítáno na bezvodou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 0,100 g v *chloroformu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 10,0 ml.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za chránění před světlem.* Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. 25,0 mg se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 2 mg *triamcinolonhexacetonidu CRL* a 2 mg *triamcinolonacetonidu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 2 ml/min, která je směsí připravenou takto: v 1000ml odměrné baňce se smíchá 750 ml *methanolu R* se 200 ml *vody R*, nechá se ustálit a pak se doplní *vodou R* po značku a znovu se promíchá,
- spektrofotometrického detektoru, 254 nm.

Při průtoku mobilní fáze 2 ml/min se kolona ustaluje po dobu asi 10 min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b) a nastaví se citlivost systému tak, aby výška hlavního píku nebyla menší než 50 % stupnice zapisovače.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek jsou retenční časy látek: triamcinolonacetonidu asi 3 min, triamcinolonhexacetonidu asi 12 min.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky triamcinolonacetonidu a triamcinolonhexacetonidu je nejméně 20. V případě potřeby se upraví koncentrace methanolu v mobilní fázi. Odděleně se nastříkne po 20 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b) a chromatogram se zaznamenává po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než polovina plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %). Nepřihlíží se k píkům rozpouštědla a k píkům, jejichž plocha je menší než 0,05násobek plochy hlavního píku porovnávacího roztoku (b).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 2,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

50,0 mg se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *lihem 96% R* na 100,0 ml. Změří se absorbance (*2.2.25*) v maximu při 238 nm a vypočítá se obsah $C_{30}H_{41}FO_7$ za použití specifické absorbance, jejíž hodnota je 291.

Uchovávání

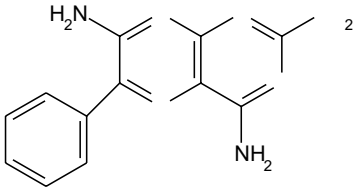
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

A. triamcinolonacetonid.

† Triamterenum

Triamteren



$C_{12}H_{11}N_7$ M_r 253,27 CAS 396-01-0

Je to 2,4,7-triamino-6-fenylpteridin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{12}H_{11}N_7$.

Vlastnosti

Žlutý krystalický prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. 0,1 g se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* 10% (*V/V*) v *ethanolu R* a zředí se stejným roztokem na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* 10% (*V/V*) v *ethanolu R* na 100 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 255 nm až 380 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 262 nm a 360 nm, a prodlevu při 285 nm.

B. Při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm kyselé roztoky, zvláště pak roztok v *kyselině mravenčí bezvodé R* (1 g/l), vykazují intenzivně modrou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Kysele reagující látky. 1,0 g se 5 min vaří s 20 ml *vody R*, ochladí se, zfiltruje a filtr se třikrát promyje vždy s 10 ml *vody R*. Filtrát a promývací vody se spojí a přidá se 0,3 ml *fenolftaleinu RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 1,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS*.

Nitrosotriaminopyrimidin. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* HF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, je-li třeba mícháním skleněnou tyčinkou. Připravuje se těsně před použitím.

Porovnávací roztok. 4 mg *nitrosotriaminopyrimidinu CRL* se rozpustí v *kyselině mravenčí bezvodé R* a zředí se jí na 100 ml.

Na vrstvu se do proužků o délce 1,5 cm nanese odděleně 20 μl každého roztoku, dvakrát po 10 μl zkoušeného roztoku a dvakrát po 10 μl porovnávacího roztoku, po každém nanesení se vrstva usuší v proudu vzduchu. Vyvíjí se *etherem R* po dráze 5 cm a nechá se uschnout na vzduchu. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 80), která obsahuje 0,5 g/l *fluoresceinu sodné soli R*, po dráze 10 cm. Vrstva se usuší v proudu vzduchu a vystaví se na několik sekund působení par amoniaku. Pozoruje se

v ultrafialovém světle při 254 nm a 365 nm; na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající nitrosotriaminopyrimidinu není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,1 %).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se rozpustí v 20 ml *dimethylsulfoxidu R*. 2 ml tohoto roztoku se zředí *methanolem R* na 50 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí *methanolem R* na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (10 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se suší na vzduchu do vymizení pachu mobilní fáze a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Asi 0,150 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 100 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

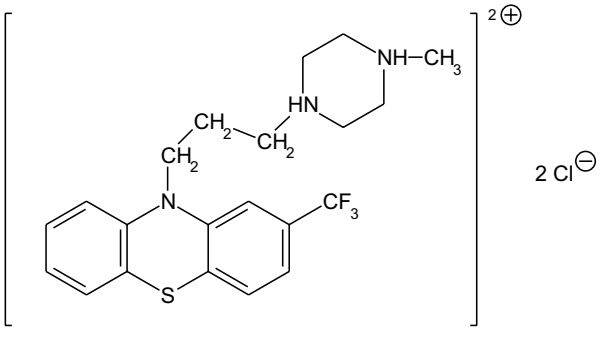
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 25,33 mg $C_{12}H_{11}N_7$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Trifluoperazini hydrochloridum

Trifluoperaziniumchlorid



$C_{21}H_{26}Cl_2F_3N_3S$ M_r 480,42 CAS 440-17-5

Je to 1-methyl-4-[3-(2-trifluormethyl-10-fenothiazinyl)propyl]piperaziniumdichlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{21}H_{26}Cl_2F_3N_3S$.

Vlastnosti

Bílý až nažloutlý krystalický prášek, hygroskopický. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 242 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

A. *Roztoky se chrání před přímým světlem a absorbance se měří ihned.* 50 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 500 ml. Měří se absorbance roztoku *(2.2.25)* při 280 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 305 nm.

5 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 100 ml. Měří se absorbance roztoku při 230 nm až 280 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 255 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 650.

B. Vyhovuje zkoušce Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií (*2.3.3*).

C. K 0,25 g ve 100ml dělicí nálevce se přidá 5 ml *vody R*, 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a intenzivně se protřepává s 20 ml *etheru R*. Etherová vrstva se promyje 5 ml *vody R*, přidá se 0,15 g *kyseliny maleinové R* a ether se odpaří. Odparek se rekrystalizuje ze 30 ml *lihu 96% R* a vysuší se; teplota tání (*2.2.14*) je asi 192 °C.

D. Asi 0,5 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 0,1 ml *bromové vody R* a asi 1 min se protřepává. Potom se po kapkách přidává za stálého silného promíchávání 1 ml *kyseliny sírové R;* vzniká červené zbarvení.

E. Asi 50 mg se rozpustí v 5 ml *vody R* a přidají se 2 ml *kyseliny dusičné R;* vznikne tmavě červené zbarvení, které přechází na světle žluté. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 1,6 až 2,5; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 20 ml.

Příbuzné látky. *Zkouška se provede za chránění před přímým světlem*. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 10 ml. Roztok se připravuje těsně před použitím.

Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *methanolu R* (5 + 95) na 200 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, *diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (10 + 10 + 80) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,5 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,300 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 10 ml *octanu rtuťnatého RS* a titruje se *kyselinou chloristou 1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,02 mg $C_{21}H_{26}Cl_2F_3N_3S$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Trifolii fibrini folium

N

Vachtový list

Synonymum. Folium trifolii fibrini

Je to usušený list druhu *Menyanthes trifoliata* L.

Vlastnosti

Droga bez pachu, intenzivně hořké chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Listy trojčetné, dlouze řapíkaté. Řapík, za sucha silně svraštělý, je až 5 mm silný, dole rozšířený v pochvu. Lístky přisedlé, obvejčité, až 10 cm dlouhé a až 5 cm široké, celokrajné nebo oddáleně zubaté, na okraji s nahnědlými nebo načervenalými hydatodami. Čepel na svrchní straně sytě zelená, na spodní straně světlejší se širokou, bělavou, silně svraštělou hlavní žilkou.

B. Pozoruje se v *chloralhydrátu RS.* Pokožka lístku na obou stranách z buněk mnohohranných až vlnitě zprohýbaných, tenkostěnných, na zevní straně se stěnou vyklenutou, na povrchu krytých tenkou, zvrásněnou kutikulou. Průduchy velké, anomocytické (*2.8.3*), četnější na spodní straně lístku. Jen velmi zřídka jednořadé, až desetibuněčné krycí chlupy. Lístek bifaciální. Palisádový parenchym dvouřadý až čtyřřadý, houbový parenchym čtyřřadý až devítiřadý s nápadně velkými intercelulárami (aerenchym). V mezofylu listu roztroušené velmi malé krystaly šťavelanu vápenatého. Hlavní žilka s buňkami pokožky se stěnami ztlustlými; hypodermis jednořadá, mezofyl s nápadně velkými intercelulárami (aerenchym). Svazky cévní kolaterální, uspořádány do oblouku, v řapíku do kruhu. Cévy šroubovitě nebo kruhovitě ztlustlé.

C. Práškovaná droga. Prášek je zelený. Droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky s anomocytickými průduchy (*2.8.3*); úlomky mezofylu s nápadně velkými intercelulárami (aerenchym); úlomky cév šroubovitě nebo kruhovitě ztlustlé.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje.

Na vrstvu se nanese do pruhu (20 mm x 3 mm) 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (8 + 15 + 77) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se postříká *zkoumadlem vanilinovým R* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C. Na chromatogramu jsou patrné intenzivně fialové až tmavě modré skvrny (foliamenthin, menthiafolin a dehydrofoliamenthin); na chromatogramu mohou být patrné další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 %. Nejvýše 7 % jinak zbarvené drogy a nejvýše 3 % jiných částí matečné rostliny.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 12,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 10,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 1,0 %.

Číslo hořkosti. Nejméně 4000. Provádí se porovnáním s chininiumchloridem, jehož číslo hořkosti je 200 000. Číslo hořkosti je definováno jako reciproká hodnota zředění, které chutná ještě hořce.

Základní roztok chininiumchloridu. 0,100 g *chininiumchloridu R* se rozpustí ve 100,0 ml *vody R*. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Zkoušený roztok. 1,00 g práškované drogy (710) se přelije 1000 ml vroucí *vody R* a za nepřetržitého míchání se zahřívá 30 min na vodní lázni. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 1000 ml. Důkladně se promíchá a pak se zfiltruje, prvních 20 ml filtrátu se odstraní.

Připraví se řada porovnávacích roztoků tak, že v první zkumavce je 4,2 ml základního roztoku chininiumchloridu a v každé následující zkumavce se objem tohoto roztoku zvyšuje o 0,2 ml až do konečného objemu 5,8 ml. Objem každé zkumavky se zředí *vodou R* na 10,0 ml. Určí se roztok nejnižší koncentrace, který chutná ještě hořce. 10,0 ml roztoku nejnižší koncentrace se převaluje v ústech 30 s tak, aby roztok přišel do styku s kořenem jazyka. Jestliže roztok nechutná hořce vyplivne se a po 1 min se ústa vypláchnou vodou. Po 10 min se zkouší stejným způsobem roztok následující vyšší koncentrace.

Korekční faktor *k* se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{5{,}00}{n},$$

v němž značí:
n - počet ml základního roztoku chininiumchloridu, který chutnal ještě hořce.

10/*k* ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 40,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku chutná hořce.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Triglycerida saturata media

Střední nasycené triacylglyceroly

Je to směs triacylglycerolů nasycených mastných kyselin, hlavně kyseliny kaprylové ($C_8H_{16}O_2$) a kyseliny kaprinové ($C_{10}H_{20}O_2$). Získává se z oleje extrahovaného z tvrdé sušené frakce endospermu *Cocos nucifera* L. nebo ze sušené frakce endospermu *Elaeis guineensis* Jacq. Obsahuje nejméně 95 % nasycených mastných kyselin s 8 a 10 atomy uhlíku.

Vlastnosti

Bezbarvá nebo slabě nažloutlá olejovitá kapalina. Jsou prakticky nerozpustné ve vodě, mísitelné s lihem 96%, s dichlormethanem, s etherem petrolejovým a s mastnými oleji.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 3,0 g a 50 ml směsi stejných objemových dílů *hydroxidu draselného 2 mol/l v lihu RS* a *lihu 96% R* se 30 min zahřívají pod zpětným chladičem. 10 ml směsi se uchová pro zkoušku totožnosti D. Ke 40 ml směsi se přidá 30 ml *vody R*, odpaří se líh a horký roztok se okyselí 25 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Po ochlazení se třepe s 50 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Etherová vrstva se třepe třikrát s 10 ml *chloridu sodného RS*, vysuší se nad *síranem sodným bezvodým R* a zfiltruje se. Ether se odpaří a za použití 0,300 g získaného zbytku se stanoví číslo kyselosti (*2.5.1*), jehož hodnota je 350 až 390.

B. Zkouška Číslo zmýdelnění, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Zkouška Složení mastných kyselin, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

D. 10 ml roztoku získaného ve zkoušce A se odpaří do sucha na vodní lázni. Zbytek se přenese do zkumavky, přidají se 0,3 ml *kyseliny sírové R* a zkumavka se uzavře zátkou, kterou prochází skleněná trubice tvaru U. Jeden konec trubice je ponořen do 3 ml roztoku *tryptofanu R* (10 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R*. Zkumavka se 10 min zahřívá v lázni se silikonovým olejem při 180 °C a uvolněné páry se jímají v roztoku tryptofanu, který se pak 1 min zahřívá na vodní lázni; vzniká fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. Zkoušená látka je čirá (*2.2.1*) a není zbarvena intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_3$ (*2.2.2, Metoda I*).

Zásadité nečistoty. 2,00 g se rozpustí ve směsi obsahující 1,5 ml *lihu 96% R* a 3,0 ml *etheru R* a přidá se 0,05 ml *modře bromfenolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,15 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS*.

Relativní hustota (*2.2.5*). 0,93 až 0,96.

Index lomu (*2.2.6*). 1,440 až 1,452.

Viskozita (*2.2.9*). 25 mPa.s až 33 mPa.s.

Číslo kyselosti (*2.5.1*). Nejvýše 0,2.

Číslo hydroxylové (*2.5.3*, *Metoda A*). Nejvýše 10.

Číslo jodové (*2.5.4*). Nejvýše 1,0.

Číslo peroxidové (*2.5.5*). Nejvýše 1,0.

Číslo zmýdelnění (*2.5.6*). 310 až 360; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Nezmýdelnitelný podíl (*2.5.7*). Nejvýše 0,5 %; stanoví se s 5,00 g zkoušené látky.

Složení mastných kyselin. Provede se zkouška na Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií (*2.4.22*).

Podíl mastných kyselin má následující složení:
- kyselina kapronová: nejvýše 2,0 %,
- kyselina kaprylová: 50,0 % až 80,0 %,
- kyselina kaprinová: 20,0 % až 50,0 %,
- kyselina laurová: nejvýše 3,0 %,
- kyselina myristová: nejvýše 1,0 %.

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 10,00 g zkoušené látky.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Chrom. Pokud je látka určena k parenterální výživě, nejvýše 0,05 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí v *diisobutylketonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se tři porovnávací roztoky rozpuštěním 2,0 g v minimálním množství *diisobutylketonu R*, přidáním 0,5 ml, 1,0 ml a 2,0 ml základního *roztoku chromu (0,1 μg Cr/ml)* a zředěním *diisobutylketonem R* na 10,0 ml.

Měří se absorbance při 357,8 nm za použití chromové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, grafitové pece jako generátoru atomů a *argonu R* jako nosného plynu.

Měď. Pokud je látka určena k parenterální výživě, nejvýše 0,1 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí v *diisobutylketonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se tři porovnávací roztoky rozpuštěním 2,0 g v minimálním množství *diisobutylketonu R*, přidáním 1,0 ml, 2,0 ml a 4,0 ml základního *roztoku mědi (0,1 μg Cu/ml)* a zředěním *diisobutylketonem R* na 10,0 ml.

Měří se absorbance při 324,7 nm za použití měděné lampy s dutou katodou jako zdroje záření, grafitové pece jako generátoru atomů a *argonu R* jako nosného plynu.

Olovo. Pokud je látka určena k parenterální výživě, nejvýše 0,1 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí v *diisobutylketonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se tři porovnávací roztoky rozpuštěním 2,0 g v minimálním množství *diisobutylketonu R*, přidáním 1,0 ml, 2,0 ml a 4,0 ml základního *roztoku olova (0,1 μg Pb/ml)* a zředěním *diisobutylketonem R* na 10,0 ml.

Měří se absorbance při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření, grafitové pece uvnitř pokryté vrstvou karbidu palladia jako generátoru atomů a *argonu R* jako nosného plynu. Kalcinace se provádí v přítomnosti kyslíku při teplotě pod 800 °C.

Nikl. Pokud je látka určena k parenterální výživě, nejvýše 0,1 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí v *diisobutylketonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se tři porovnávací roztoky rozpuštěním 2,0 g v minimálním množství *diisobutylketonu R*, přidáním 1,0 ml, 2,0 ml a 4,0 ml základního *roztoku niklu (0,1 μg Ni/ml)* a zředěním *diisobutylketonem R* na 10,0 ml.

Měří se absorbance při 232 nm za použití niklové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, grafitové pece jako generátoru atomů a *argonu R* jako nosného plynu.

Cín. Pokud je látka určena k parenterální výživě, nejvýše 0,1 μg/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí v *diisobutylketonu R* a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se tři porovnávací roztoky rozpuštěním 2,0 g v minimálním množství *diisobutylketonu R*, přidáním 1,0 ml, 2,0 ml a 4,0 ml základního *roztoku cínu (0,1 μg Sn/ml)* a zředěním *diisobutylketonem R* na 10,0 ml.

Měří se absorbance při 286,3 nm za použití cínové lampy s dutou katodou jako zdroje záření, grafitové pece uvnitř pokryté vrstvou karbidu palladia jako generátoru atomů a *argonu R* jako nosného plynu.

Uchovávání

V dobře uzavřených zcela naplněných obalech, chráněny před světlem.

Označování

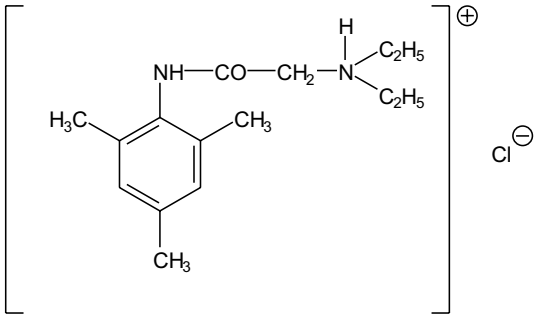
V označení na obalu se uvede, zda je látka určena pro parenterální výživu.

† Trimecaini hydrochloridum

N

Trimekainiumchlorid

Synonymum. Trimecainium chloratum



$C_{15}H_{25}ClN_2O$ M_r 284,83 CAS 1027-14-1

Je to (2,4,6-trimethylfenylkarbamoylmethyl)diethylamoniumchlorid. Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{15}H_{25}ClN_2O$, počítáno na vysušenou látku.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 140 °C až 142 °C, stanoví se s vysušenou látkou.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *trimekainiumchloridu CRL*. Tablety se připraví za použití *chloridu draselného R*.

Jestliže se spektrum zkoušené látky liší od spektra referenční látky, rozpustí se odděleně obě látky v co nejmenším množství *lihu 96 % R*, odpaří se při 60 °C do sucha a zaznamenají se nová spektra.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Cizí organické látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a intenzitou shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,250 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 6,0; měří se roztok S.

Cizí organické látky. Provede se tenkovrstevná chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 100 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok. 100 mg *trimekainiumchloridu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl obou roztoků a vyvíjí se směsí objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* (50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není, kromě hlavní skvrny, žádná jiná skvrna.

Mesidin. Ke 2,0 ml roztoku S se přidají 3,0 ml *vody R*, 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l RS*, 2,0 ml *dusitanu sodného 1 mol/l RS* a po promíchání se 3 min nechá stát. Potom se přidají 2,0 ml roztoku *amidosíranu amonného R* (50 g/l) a za častého promíchávání se nechá 3 min stát. Potom se přidá 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *2-naftolu R* (1,0 g/l) v roztoku *hydroxidu sodného R* (42 g/l), promíchá se a ihned se přidá 10,0 ml *lihu 96% R*. Protřepává se do rozpuštění zákalu a potom se zředí *vodou R* na 25,0 ml. Absorbance (*2.2.25*) roztoku měřená při 500 nm až 510 nm ve 20mm vrstvě proti kontrolnímu roztoku získanému při slepé zkoušce není vyšší než 0,10.

Sírany (*2.4.13*). 0,5 g se rozpustí ve 25 ml *vody destilované R*. 15 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,05 %).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 4,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C do konstantní hmotnosti.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g látky.

Stanovení obsahu

0,200 g se rozpustí v 15,0 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 5,0 ml *octanu rtuťnatého RS*, přidá se 0,05 ml *violeti krystalové RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* z fialového do modrého zbarvení. Provede se slepá zkouška.

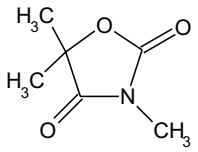
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,48 mg $C_{15}H_{25}ClN_2O$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Trimethadionum

Trimethadion



$C_6H_9NO_3$ M_r 143,14 CAS 127-48-0

Je to 3,5,5-trimethyloxazolidin-2,4-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_6H_9NO_3$.

Vlastnosti

Bezbarvé nebo téměř bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 45 °C až 47 °C, stanoví se bez předchozího sušení.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *trimethadionu CRL*. Měří se tableta připravená za použití 3 mg zkoušené látky v 0,4 g *bromidu draselného R* a tableta připravená stejným způsobem za použití referenční látky.

C. Ke 2 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *hydroxidu barnatého RS*. Vznikne bílá sraženina, která se přidáním 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* rozpustí.

D. 0,3 g se rozpustí ve směsi obsahující 5 ml *hydroxidu draselného v lihu RS* a 5 ml *lihu 96% R* a nechá se 10 min stát. Pak se přidá 0,05 ml *fenolftaleinu RS1*, opatrně se neutralizuje *kyselinou chlorovodíkovou R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Odparek se čtyřikrát protřepává vždy s 5 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se zfiltrují a odpaří do sucha. Zbytek se rekrystalizuje z 5 ml *toluenu R* a vysuší se; teplota tání zbytku (*2.2.14*) je asi 80 °C.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,0 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 40 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml roztoku S se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS* nebo *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 6 h v exsikátoru nad *silikagelem bezvodým R.*

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*) za použití *dekanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 0,125 g *dekanolu R* se rozpustí v *ethanolu R* a zředí se jím na 25 ml.
Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,100 g *trimethadionu CRL* se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,75 m a vnitřního průměru 3 mm naplněné *styrendivinylbenzen-kopolymerem R* (125 μm až 150 μm).
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 20 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

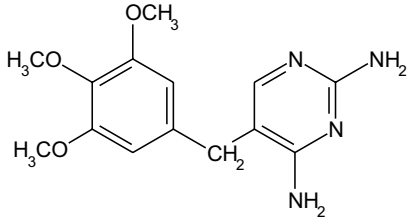
Teplota kolony se udržuje na 210 °C, teplota nástřikového prostoru na 240 °C a teplota detektoru na 270 °C. Nastříkne se po 1 μl každého roztoku.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Trimethoprimum

Trimethoprim



$C_{14}H_{18}N_4O_3$ M_r 290,32 CAS 738-70-5

Je to 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{18}N_4O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo nažloutlý prášek. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96% a prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 199 C až 203 C.

B. 20 mg se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,1 mol/l RS* na 10,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 287 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 245.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *trimethoprimu CRL.*

D. Asi 25 mg se zahřátím rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové 0,005 mol/l RS*, přidají se 2 ml roztoku *manganistanu draselného R* (16 g/l) v *hydroxidu sodném 0,1 mol/l RS* a zahřeje se k varu. K horkému roztoku se přidá 0,4 ml *formaldehydu R*, zamíchá se a přidá se 1 ml *kyseliny sírové 0,5 mol/l RS*, znovu se zamíchá a zahřeje k varu, pak se ochladí a zfiltruje. K filtrátu se přidají 2 ml *chloroformu R* a intenzivně se protřepává. Chloroformová vrstva při pozorování v ultrafialovém světle při 365 nm vykazuje zelenou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v 10 ml směsi objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 4,5 + 5). Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok HŽ (*2.2.2, Metoda II*).

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 0,2 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 4,5 + 5) a zředí se stejnou směsí rozpouštědel na 5 ml.
Porovnávací roztok. 1 ml zkoušeného roztoku se zředí směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *chloroformu R* (1 + 4,5 + 5) na 10 ml a promíchá se. 1 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí rozpouštědel na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (2 + 5 + 10 - + 85) po dráze 17 cm. Vrstva se 5 min suší v proudu studeného vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na dno komory se umístí odpařovací miska obsahující směs objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové RS*, *vody R* a roztoku *manganistanu draselného R* (15 g/l) (1 + 1 + 2), komora se uzavře a nechá se 15 min stát. Suchá vrstva se vloží do komory nasycené parami chloru a komora se opět uzavře. Po 5 min se vrstva vyjme a vystaví se působení proudu studeného vzduchu tak dlouho, až je chlor odstraněn a až část vrstvy pod startem nereaguje

s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS* za vzniku modrého zbarvení. Vrstva se postříká *škrobem s jodidem draselným RS* a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (0,2 %).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 29,03 mg $C_{14}H_{18}N_4O_3$.

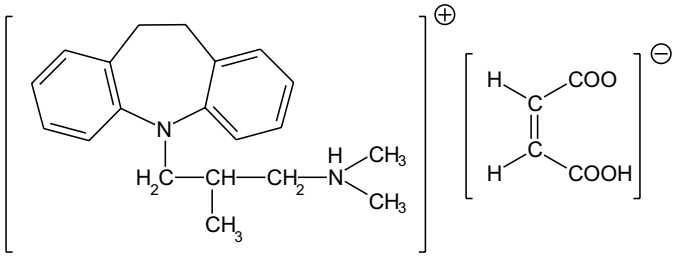
Uchovávání

Separandum.

† Trimipramini hydrogenomaleas

Trimipraminiumhydrogenmaleinat

Synonymum. Trimipramini maleas



$C_{24}H_{30}N_2O_4$ M_r 410,51 CAS 521-78-8

Je to (*RS*)-{3-[5-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepinyl)]-2-methylpropyl}dimethylamonium-hydrogenmaleinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{24}H_{30}N_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 140 °C až 144 °C.

B. 40,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 250 nm a prodlevu při 270 nm. Specifická absorbance v maximu je asi 205 až 235.

C. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *trimipraminiumhydrogenmaleinatu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 56 mg *kyseliny maleinové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do 10mm proužků po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *kyseliny mravenčí bezvodé R* a *diisopropyletheru R* (3 + 7 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se nejprve několik minut suší na vzduchu, pak 10 min při 120 °C a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se nachází skvrna na startu a další skvrna se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,5 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 25 ml. Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok (a). 0,50 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml. Připravuje se těsně před použitím.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *trimipraminiumhydrogenmaleinatu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se stejným rzpouštědlem na 10 ml. Připravuje se těsně před použitím.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 25 ml.
Porovnávací roztok (d). 10 mg *iminodibenzylu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml. Připravuje se těsně před použitím.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *ethanolu R* a *toluenu R* (0,7 + 10 + 90) po dráze 15 cm. Vrstva se nechá 15 min sušit na vzduchu a pak se postříká roztokem *dichromanu draselného R* (5 g/l) ve směsi objemových dílů *kyseliny sírové R* a *vody R* (1 + 4) a ihned se pozoruje. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající iminodibenzylu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (0,2 %); žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající

iminodibenzylu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %); nejvýše tři skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Nepřihlíží se ke skvrnám na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (20 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 4 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,3500 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace (*2.2.20*) bodu ekvivalence.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 41,05 mg $C_{24}H_{30}N_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

Tritici amylum

1998

Pšeničný škrob

Synonymum. Amylum tritici

CAS 9005-25-8

Získává se z obilek druhu *Triticum aestivum* L. (*T. vulgare* VILL.).

Vlastnosti

Velmi jemný bílý prášek vrzající mezi prsty. Je prakticky nerozpustný ve studené vodě a v lihu 96%. Neobsahuje škrobová zrna jiných rostlinných druhů. Může obsahovat malé množství úlomků tkání matečné rostliny.

Zkoušky totožnosti

A. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných objemových dílů *glycerolu R a vody R*. Škrobová zrna jsou velká a malá, jen zřídka jsou přítomna škrobová zrna střední velikosti.

Velká zrna o průměru 10 μm až 45 μm jsou při čelním pohledu čočkovitá nebo řidčeji ledvinitá, středové hilum a vrstvení není patrné nebo je jen sotva patrné, zrna jsou někdy na okrajích popraskaná. Při bočném pozorování jsou zrna oválná a vřetenovitá, hilum je patrné jako trhlina protáhlá ve směru podélné osy. Malá zrna, kulovitá nebo mnohostěnná, o průměru 2 μm až 10 μm.

V polarizovaném světle je patrný výrazný černý kříž protínající hilum.

B. 1 g se suspenduje v 50 ml *vody R*, vaří se 1 min a pak se ochladí; vznikne řídký, zakalený sliz.

C. K 1 ml slizu ze zkoušky totožnosti B se přidá 0,05 ml *jodu RS1;* vznikne tmavě modré zbarvení, které po zahřátí zmizí a po ochlazení opět vznikne.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 5,0 až 8,0. 5,0 g se protřepává 60 s s 25,0 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a pak se nechá 15 min stát.

Železo *(2.4.9)*. 1,5 g se protřepe s 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Pozoruje se pod mikroskopem ve směsi stejných dílů *glycerolu R* a *vody R;* nejsou přítomny stopy buněčných stěn a zbytků cytoplazmatu.

Celkové bílkoviny. Nejvýše 0,3 % celkových bílkovin (odpovídá 0,048 % dusíku, přepočítávací faktor je 5,7). Provede se stanovení dusíku mineralizací kyselinou sírovou *(2.5.9)*. Postup je upraven takto: stanoví se s 6,0 g, částice ulpělé na hrdle baňky se opláchnou 25 ml *kyseliny sírové R*, směs se zahřívá tak dlouho, až je roztok čirý; přidá se 45 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

Oxidační látky *(2.5.30)*. Vyhovuje požadavkům statě Oxidanty.

Oxid siřičitý *(2.5.29)*. Nejvýše 50 μg/g.

Mikrobiální znečištění. Nejvýše 10^3 bakterií/g a nejvýše 10^2 hub/g; stanoví se plotnovou metodou *(2.6.12)*. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 15,0 %; 1,000 g se suší 90 min v sušárně při 130 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,6 %; stanoví se s 1,00 g.

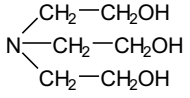
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Trolaminum

N

Trolamin



$C_6H_{15}NO_3$ M_r 149,19 CAS 102-71-6

Je to směs ethanolaminů obsahující převážně 2,2′,2″-nitrilotriethanol [$N(C_2H_4OH)_3$] s proměnlivým množstvím 2,2′-iminobisethanolu [$HN(C_2H_4OH)_2$] a malým množstvím 2-aminoethanolu [$NH_2(C_2H_4OH)$]. Vztaženo na bezvodou látku, obsahuje 99,0 % až 103,0 % celkových bází, počítáno jako (2,2′,2″-nitrilotriethanol) $C_6H_{15}NO_3$.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá viskózní tekutina, silně hygroskopická. Je bez pachu nebo slabě páchne po aminech. Je velmi snadno rozpustný ve vodě a v lihu 96 %, je těžce rozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Relativní hustota *(2.2.5)*. 1,120 až 1,130.

B. Index lomu *(2.2.6)*. 1,482 až 1,485.

C. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku eluovaného po píku rozpouštědel na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku eluovanému po píku rozpouštědel na chromatogramu porovnávacího roztoku.

D. K 1 ml se přidá 0,3 ml *síranu měďnatého RS*. Vznikne modré zbarvení, které se nezmění po přidání 2,5 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barvený roztok H_6 *(2.2.2)*.

Příbuzné látky. Provede se plynová chromatografie (*2.2.28*).

Zkoušený roztok. 0,100 g se rozpustí v 10 ml směsi stejných objemových dílů *acetanhydridu R* a *pyridinu bezvodého R* a 30 min se zahřívá při 50 °C.
Porovnávací roztok. 50 mg *ethanolaminu R*, 50 mg *diethanolaminu R* a 0,400 g *triethanolaminu CRL* se rozpustí v 50 ml směsi stejných objemových dílů *acetanhydridu R* a *pyridinu bezvodého R* a 30 min se zahřívá při 50 °C.

Chromatografický postup se provádí obvykle za použití:
- skleněné kolony délky 2 m a vnitřního průměru 2,2 mm naplněné *křemelinou silanizovanou pro plynovou chromatografii R* (např. Gas-chrom Q, 80 až 100 mesh), impregnovanou 5 % *kyanoethyl(25%)methyl(75%)siloxanu R* (např. XE 60),
- helia pro chromatografii jako nosného plynu s průtokovou rychlostí 35 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 140 ° C, teplota nástřikového prostoru a detektoru se udržuje na 250 °C. Nastříkne se odděleně po 1 μl každého roztoku. Teplota kolony se zvyšuje rychlostí 2 °C/min do 200 °C, při které se udržuje po dobu 5 min.

Retenční čas ethanolaminu je asi 12 min, triethanolaminu asi 15 min a diethanolaminu asi 23 min.

Na chromatogramu zkoušeného roztoku činí součet ploch všech píků, kromě píku rozpouštědla, 100 %. Plocha píku odpovídajícího ethanolaminu je nejvýše 0,2 %, plocha píku odpovídajícího diethanolaminu je nejvýše 2,0 %. Součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, je nejvýše 2,5 %. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku jsou tři zřetelně oddělené píky.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 12,0 ml roztoku S vyhovuje zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,05 %; stanoví se s 2,000 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

2,000 g se rozpustí v 75 ml *vody prosté oxidu uhličitého R,* přidá se 0,3 ml *červeně methylové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l VS* do vzniku červeného zbarvení.

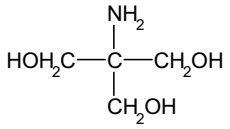
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l VS* odpovídá 149,2 mg $C_6H_{15}NO_3$

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Trometamolum

Trometamol



$C_4H_{11}NO_3$ M_r 121,14 CAS 77-86-1

Je to 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_4H_{11}NO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v ethylacetatu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, je silně alkalický (*2.2.4*).

B. Teplota tání (*2.2.14*): 168 °C až 174 °C.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) zkoušené látky se shoduje se spektrem *trometamolu CRL.*

D. Hodnotí se chromatogramy získané při zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se shoduje polohou, zbarvením a velikostí s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 10,0 až 11,5; měří se čerstvě připravený roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*. Před nanášením roztoků se vrstva promyje *methanolem R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se zahřátím rozpustí v 1 ml *vody R* a zředí se *methanolem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *trometamolu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku zředěného RS1* a *2-propanolu R* (10 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší při 100 °C až 105 °C a postříká se roztokem *manganistanu draselného R* (5 g/l) v roztoku *uhličitanu sodného R* (10 g/l). 10 min se nechá stát a potom se pozoruje v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (1,0 %).

Chloridy (*2.4.4*). K 10 ml roztoku S se přidá 2,5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 2,0 g se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok se zneutralizuje *kyselinou chlorovodíkovou RS* a zředí se *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 µg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití základního *roztoku olova (1 µg Pb/ml)*.

Železo (*2.4.9*). 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 µg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; suší se 1,000 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %, stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,03 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 20 ml *vody R*. Přidá se 0,2 ml *červeně methylové RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* do změny žlutého zbarvení roztoku na červené.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 12,11 mg $C_4H_{11}NO_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

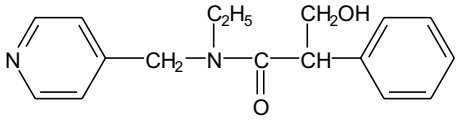
V označení na obalu se uvede, zda je látka:
- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

Nečistoty

A. 2-nitro-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol.

† Tropicamidum

Tropikamid



$C_{17}H_{20}N_2O_2$ M_r 284,36 CAS 1508-75-4

Je to (*RS*)-N-ethyl-2-fenyl-3-hydroxy-N-[(4-pyridyl)methyl]propionamid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{17}H_{20}N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: C.
Alternativní sestava zkoušek: A, B, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 95 C až 98 C.

B. 20,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l RS* na 20,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) při 230 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 254 nm. Specifická absorbance v maximu je 170 až 190.

C. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tropikamidu CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

E. Asi 5 mg se rozpustí ve 3 ml směsi obsahující 9 ml *acetanhydridu R*, 1 ml *kyseliny octové R* a 0,1 g *kyseliny citronové R* a zahřívá se 5 min až 10 min na vodní lázni; vznikne červenožluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 10 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Optická otáčivost (*2.2.7*). -0,1 až +0,1 ; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,5 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 25,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 20 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *tropikamidu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 2 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *dichlormethanem R* na 5 ml.
Porovnávací roztok (d). 20 mg *(4-pyridylmethyl)ethylaminu R* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 20 ml. 1 ml tohoto roztoku a 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *dichlormethanem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 5 + 95) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna je intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Kyselina tropová. K 10,0 mg se přidá 5 mg *tetraboritanu sodného R* a 0,35 ml čerstvě připraveného roztoku *dimethylaminobenzaldehydu R* (100 g/l) ve směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny sírové R* (1 + 9). Zahřívá se 3 min na vodní lázni, pak se ochladí v ledové lázni a přidá se 5 ml *acetanhydridu R;* nevzniká fialovočervené zbarvení (0,05 %).

Chloridy. (*2.4.4*). 1,0 g se zahřátím rozpustí v 8 ml *kyseliny octové R*, ochladí se a zředí se stejnou kyselinou na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (100 µg/g).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší 4 h v sušárně při 80 °C a při tlaku nepřevyšujícím 0,7 kPa.

Síranový popel (*2.2.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

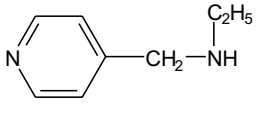
0,200 g se rozpustí v 50 ml *kyseliny octové ledové R*, přidá se 0,2 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* do změny oranžového zbarvení na zelené.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,44 mg $C_{17}H_{20}N_2O_2$.

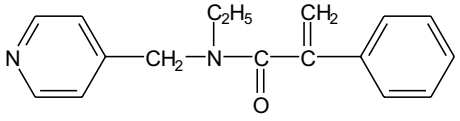
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

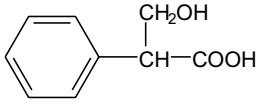
Nečistoty



A. (4-pyridylmethyl)ethylamin,



B. N-ethyl-2-fenyl-N-(4-pyridylmethyl)-2-propenamid,

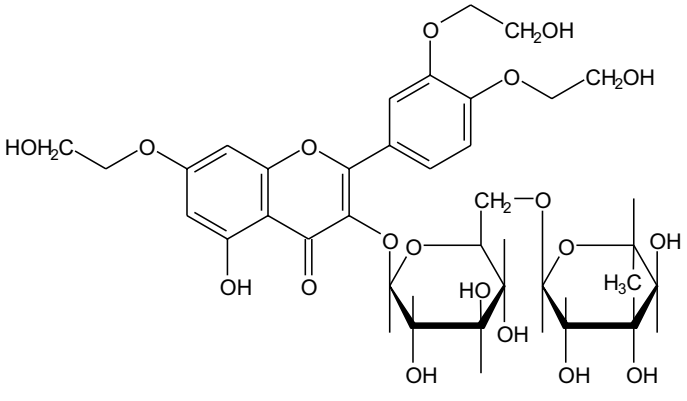


C. kyselina (*RS*)-2-fenyl-3-hydroxypropionová (kyselina tropová).

Troxerutinum

N

Troxerutin



$C_{33}H_{42}O_{19}$ M_r 742,68 CAS 7085-55-4

Je to směs mono-, di-, tri- a tetrahydroxyethyletherů rutinu, vyjádřeno jako 7,3′,4′-tris[O-(hydroxyethyl)]rutin. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 103,0 %, počítáno jako $C_{33}H_{42}O_{19}$.

Vlastnosti

Žlutý slabě hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu a v lihu 96 %, prakticky nerozpustný v ethylacetatu.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Deriváty hydroxyethyletheru rutinu a příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku retenční čas a velikost hlavního píku odpovídají retenčnímu času a velikosti hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Asi 0,1 g se rozpustí ve 2 ml *vody R*, zředí se jí na 20 ml a přidají se 2 ml roztoku *chloridu železitého R* (0,5 g/l); roztok se zbarví červenohnědě. K 10 ml tohoto roztoku se přidá 0,2 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (150 g/l); zbarvení roztoku se změní na oranžově žluté. Přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové RS;* zbarvení roztoku se změní na zelenožluté.

C. Asi 50 mg se rozpustí v 10 ml *methanolu R*, přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a 0,2 g *zinku R* práškovaného; vznikne fialově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.4)* 6,0 až 7,2; měří se roztok zkoušené látky (50 g/l) ve *vodě prosté oxidu uhličitého R*.

Deriváty hydroxyethyletheru rutinu a příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 1 ml roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,25 g *troxerutinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml. 1 ml roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (např. Inertsil nebo Hyperosil ODS 5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *dihydrogenfosforečnanu sodného 0,01 mol/l RS,* jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7 *hydroxidem sodným 1 mol/l RS*, (13 + 87) s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 210 nm.

Teplota kolony se udržuje na 60 °C. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku a chromatogram se zaznamenává po dobu nejméně 80 min. Na chromatogramu porovnávacího roztoku při dodržení předepsaných podmínek je hlavní pík odpovídající 7,3′,4′-tris[O-(2-hydroxyethyl)]rutinu s retenčním časem asi 30 min a vedlejší píky, viz obrázek 1, z nichž pík odpovídající 5,7,3′,4′-tetrakis[O--(2-hydroxyethyl)]rutinu má relativní retenční čas vztažený k hlavnímu píku asi 0,50 a pík odpovídající 7,4′-bis[O-(2-hydroxyethyl)]rutinu má relativní retenční čas vztažený k hlavnímu píku asi 0,92. Je-li třeba, upraví se obsah acetonitrilu v mobilní fázi.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi hlavním píkem (7,3′,4′-tris[O-(2-hydroxyethyl)]rutin) a píkem 7,4′-bis[O-(2-hydroxyethyl)]rutinu je nejméně 1,2 a rozlišení mezi hlavním píkem a píkem č. 5, viz obrázek 1, je nejméně 1,1.

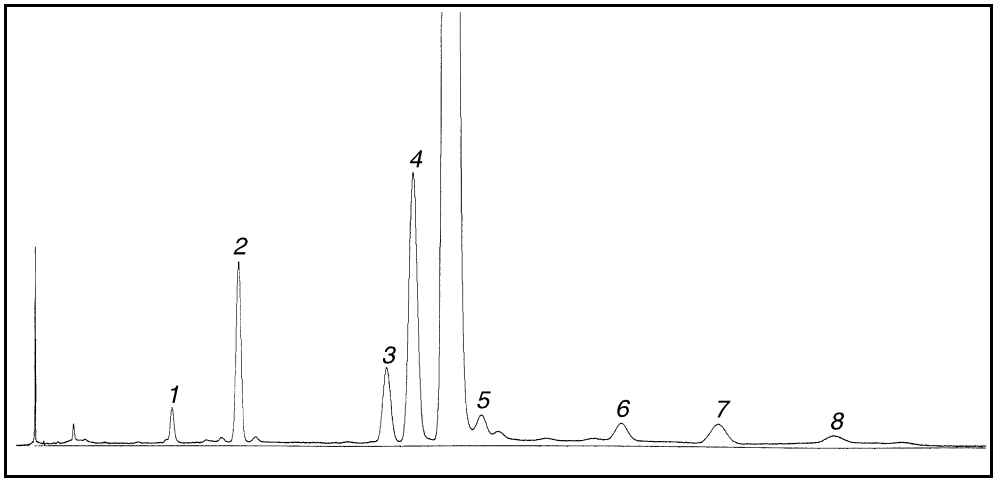
Nastříkne se 20 μl zkoušeného roztoku a zaznamenávají se chromatogramy po dobu nejméně 80 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha hlavního píku (7,3′,4′-tris[O-(2-hydroxyethyl)]rutinu) je nejméně 80,0 % celkové plochy všech píků. Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Chloridy (*2.4.4*). Nejvýše 0,2 %. 1,000 g se rozpustí ve 30 ml *vody R*, přidá se 30 ml *kyseliny sírové R* (300 g/l) a titruje se *dusičnanem stříbrným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,55 mg Cl.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g zkoušené látky vyhovují zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 4,0 %; 0,500 g se suší v sušárně při 125 °C.



Obr. 1. Vzorový chromatogram

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,2 %; stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.

Mikrobiální znečištění*(2.6.12)*. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v 1 gramu. Stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli (2.6.13)*.

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí stejným rozpouštědlem na 100,0 ml. Změří se absorbance *(2.2.25)* roztoku v maximu při 349 nm.

Vypočítá se celkový obsah derivátů rutinu, vyjádřený jako $C_{33}H_{42}O_{19}$, za použití zjištěné hodnoty absorbance a specifické absorbance, jejíž hodnota je 250.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před vlhkostí.

Nečistoty

A. 5,7,3′,4′-tetrakis[O-(2-hydroxyethyl)]rutin,
B. 7,4′-bis[O-(2-hydroxyethyl)]rutin.

Trypsinum

Trypsin

CAS 9002-07-7

Je to proteolytický enzym získaný aktivací trypsinogenu extrahovaného ze slinivky břišní zdravých savců. Účinnost je nejméně 0,5 mikrokatalů v miligramu, počítáno na vysušenou látku.

Nejvyšší enzymová účinnost je v roztoku při pH 8; účinnost je reverzibilně inhibována při pH 3, při kterém je enzym nejstabilnější.

Výroba

Zvířata, ze kterých je trypsin získáván, musí splňovat požadavky oprávněné autority na zdravá zvířata určená pro humánní konzumaci. Pokud se pro výrobu použije hovězí tkáň, má být zvířecí zdroj prostý bovinní spongiformní encefalopatie a neměl být nikdy vystaven rizikovým faktorům, jako je výkrm bílkovinami přežvýkavců. K dosažení tohoto cíle mají zvířata pocházet z ověřených zdrojů. Při výběru zdroje zvířecí tkáně, jež se má použít, se má vzít v úvahu relativní nakažlivost a možné riziko spojené s různými tkáněmi. Různé kategorie rizika popisují platná pravidla Evropské unie "Směrnice pro snížení na minimum rizika přenosu původců spongiformní encefalopatie prostřednictvím léčivých přípravků" (Guidelines for minimising the risk of transmission of agents causing spongiform encephalopathies via medicinal products) a platné pokyny Světové zdravotnické organizace.

Trypsin se vyrábí validovanými metodami extrakce a purifikace v podmínkách zajišťujících minimální mikrobiologickou kontaminaci; výrobní metody musí prokazatelně redukovat jakoukoliv kontaminaci viry nebo jinými známými původci infekce na přijatelné limity.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický nebo amorfní prášek. Je mírně rozpustný ve vodě. Amorfní forma je hygroskopická.

Zkoušky totožnosti

A. 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 100 ml. Na bílé kapkovací destičce se smíchá 0,1 ml tohoto roztoku s 0,2 ml *tosylarginiummethylesterchloridu RS;* do 3 min vznikne červenofialové zabarvení.

B. 0,5 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 5 ml, přidá se 0,1 ml roztoku *tosyllysylchloromethanhydrochloridu R* (20 g/l). Upraví se pH na hodnotu 7, 2 h se třepe a pak se zředí *vodou R* na 50 ml. V důlku bílé kapkovací destičky se smíchá 0,1 ml tohoto roztoku s 0,2 ml *tosylarginiummethylesterchloridu RS;* do 3 min nevznikne červenofialové zabarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,10 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztoku S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze III (*2.2.1*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,0 až 6,0; měří se roztok S.

Absorbance (*2.2.25*). 30,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. Roztok vykazuje absorpční maximum při 280 nm a minimum při 250 nm. Specifická absorbance v maximu je 13,5 až 16,5 a v minimu není větší než 7,0.

Chymotrypsin. K 1,8 ml *tlumivého roztoku o pH 8,0* se přidá 7,4 ml *vody R* a 0,5 ml roztoku *acetyltyrosinethylesteru 0,2 mol/l RS*. Během míchání se přidá 0,3 ml roztoku S a sleduje se čas. Přesně po 5 min se změří pH (*2.2.3*) (zkoušený roztok). Současně se za stejných podmínek připraví porovnávací roztok nahrazením roztoku S 0,3 ml roztoku *chymotrypsinu BRP* (0,5 g/l) a měří se pH (*2.2.3*) přesně 5 min po přidání chymotrypsinu. Hodnota pH zkoušeného roztoku je vyšší než hodnota pH porovnávacího roztoku.

Histamin (*2.6.10*). Nejvýše 1 µg báze histaminu na 0,2 mikrokatalu trypsinové účinnosti. Použije se roztok zkoušené látky (10 g/l) v *tlumivém roztoku boritanovém o pH 8,0 (0,0015 mol/l)* inaktivovaný zahříváním na vodní lázni po dobu 30 min. Pro ředění se použije roztok *chloridu sodného R* (9 g/l).

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 0,500 g se suší 2 h při 60 °C a tlaku nepřevyšujícím 670 Pa.

Mikrobiální znečistění (*2.6.12*). Celkový počet živých mikroorganismů je nejvýše 10^4 v 1g, stanoví se plotnovou metodou. Vyhovuje zkoušce na nepřítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* (*2.6.13*).

Stanovení účinnosti

Účinnost trypsinu se stanoví porovnáním rychlosti, s jakou hydrolyzuje *benzoylargininethylesterhydrochlorid R,* s rychlostí, s jakou hydrolyzuje *trypsin BRP* stejný substrát za stejných podmínek.

Přístrojové vybavení. Reakční nádoba o objemu 30 ml vybavená:
- zařízením, které udržuje teplotu na (25,0 ± 0,1) °C,
- zařízením na míchání (např. magnetická míchačka),
- víkem s otvory pro elektrody, pro hadici na přívod dusíku, pro konec byrety a pro přidávání zkoumadel.

Lze použít automatické nebo manuální titrační zařízení. U manuálního zařízení je byreta dělená po 0,005 ml a pH-metr s velkým rozsahem je vybaven skleněnou a kalomelovou elektrodou.

Zkoušený roztok. Dostatečné množství zkoušené látky se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml tak, aby výsledný roztok obsahoval asi 700 nanokatalů/ml. *Porovnávací roztok.* 25,0 mg *trypsinu BRP* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,001 mol/l RS* a zředí se jí na 25,0 ml.

Roztoky se uchovávají při 0 °C až 5 °C. 1 ml každého roztoku se zahřívá 15 min při asi 25 °C a použije se po 50 µl každého roztoku pro každou titraci, která se provádí v dusíkové atmosféře. K 10,0 ml *tlumivého roztoku boritanového o pH 8,0 (0,0015 mol/l)* v titrační nádobě se během míchání přidá 1,0 ml čerstvě připraveného roztoku *benzoylargininethylesterhydrochloridu R* (6,86 g/l). Po ustálení teploty na hodnotě (25,0 ± 0,1) °C (tj. asi po 5 min) se nastaví pH přesně na hodnotu 8,0 pomocí *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*. Přidá se 50 µl zkoušeného roztoku a začne se měřit čas (stopky). Hodnota pH 8,0 se udržuje přidáváním *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* mikrobyretou ponořenou do roztoku; přidaný objem se zaznamenává každých 30 s a reakce probíhá 8 min. Vypočítá se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za 1 sekundu. Stejným způsobem se provede titrace porovnávacího roztoku a vypčítá se spotřeba *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za 1 sekundu.

Účinnost v mikrokatalech v miligramu se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{m' \cdot V}{m \cdot V'} \cdot A ,$$

v němž značí:
m - navážku zkoušené látky v miligramech,
m´ - navážku *trypsinu BRP* v miligramech,
V - spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za sekundu u zkoušeného roztoku,
V´ - spotřebu *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* za sekundu u porovnávacího roztoku,
A - účinnost *trypsinu BRP* v mikrokatalech na miligram.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C.

Označení

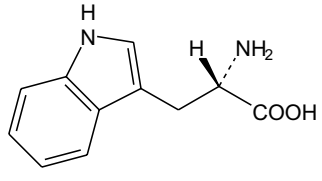
V označení na obalu se uvede účinnost v mikrokatalech v miligramu.

Tryptophanum

1998

Tryptofan

Synonymum. L-Tryptophanum



$C_{11}H_{12}N_2O_2$ M_r 204,23 CAS 73-22-3

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propionová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_{11}H_{12}N_2O_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický nebo amorfní prášek. Je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a minerálních kyselin.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tryptofanu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, zbarvením a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Asi 20 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 5 ml *dimethylaminobenzaldehydu RS6* a 2 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a zahřeje se na vodní lázni; vzniká nachově modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,1 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -30,0° až -33,0°, počítáno na vysušenou látku. Měří se následující roztok: 0,25 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím na vodní lázni, ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *tryptofanu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí směsí stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *tryptofanu CRL* a 10 mg *tyrosinu CRL* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *vody R* a zředí se stejnou směsí na 25 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

1,1′-Ethylidenbistryptofan a jiné příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Tlumivý roztok o pH 2,3. 3,90 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R* se rozpustí v 1000 ml *vody R*, přidá se asi 700 ml roztoku *kyseliny fosforečné R* (2,9 g/l) a stejnou kyselinou se upraví pH na hodnotu 2,3.

Následující roztoky se připraví těsně před použitím.

Standardní roztok. 10,0 mg *N-acetyltryptofanu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí stejnou směsí na 100,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 10,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,10 g se rozpustí ve standardním roztoku a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,0 mg *1,1′-ethylidenbistryptofanu R* se rozpustí ve směsi objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 90) a zředí se stejnou směsí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí standardním roztokem na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 90) na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 0,10 g zkoušené látky se rozpustí v porovnávacím roztoku (c) a zředí se jím na 10,0 ml.

Porovnávací roztok (e). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* (10 + 90) na 10,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,7 ml/min, kterou jsou následující roztoky:
  - *mobilní fáze A* - směs objemových dílů *acetonitrilu R* a tlumivého roztoku o pH 2,3 (115 + + 885),
  - *mobilní fáze B* - směs objemových dílů *acetonitrilu R* a tlumivého roztoku o pH 2,3 (350 + + 650),
- gradientového programu za použití následujících podmínek:

Čas (min)	Mobilní fáze A % *(V/V)*	Mobilní fáze B % *(V/V)*	Poznámky
0 - 10	100	0	izokraticky
10 - 45	100 → 0	0 → 100	lineární gradient
45 - 65	0	100	izokraticky
65 - 66	0 → 100	100 → 0	lineární gradient
66 - 80	100	0	ustalování

- spektrofotometrického detektoru, 220 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b), 20 µl porovnávacího roztoku (d) a 20 µl porovnávacího roztoku (e). Jsou-li chromatogramy zaznamenány za předepsaných podmínek, retenční časy látek jsou: tryptofanu asi 8 min, N-acetyltryptofanu asi 29 min a 1,1′-ethylidenbistryptofanu asi 34 min. Nastaví se citlivost systému tak, aby výška píku N-acetyltryptofanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) nebyla menší než 50 % celé stupnice zapisovače.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže:
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) rozlišení mezi píky N-acetyltryptofanu a 1,1-ethylidenbistryptofan je nejméně 8,0. Zvýšením mobilní fáze A v průběhu eluce se prodlouží retenční časy a zlepší se rozlišení,
- na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) je signál píku k šumu nejméně 15.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku (a) a 20 µl zkoušeného roztoku (b). Zjistí se, není-li na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) pík se stejným retenčním časem, jako má pík N-acetyltryptofanu (v takovém případě se provede korekce píku N-acetyltryptofanu). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) plocha píku odpovídajícího 1,1′-ethylidenbistryptofanu není větší než 0,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (10 µg/g). Součet ploch všech píků s retenčním časem menším, než má tryptofan, není větší než 0,5násobek plochy píku odpovídajícího N-acetyltryptofanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (100 µg/g). Součet ploch všech píků s retenčním časem větším, než má tryptofan, kromě píku N-acetyltryptofanu a píku do 1,8násobku retenčního času N-acetyltryptofanu, není větší než 1,5násobek plochy píku odpovídajícího N-acetyltryptofanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (300 µg/g). Nepřihlíží se k píkům s plochou menší než 0,02násobek plochy píku odpovídajícího N-acetyltryptofanu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g) bez dalšího přidání kyseliny dusičné.

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody destilované R* (5 + 25) a zředí se stejnou směsí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 0,10 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (200 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 0,2 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 0,50 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné R*S a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a 3 min se třepe. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (20 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

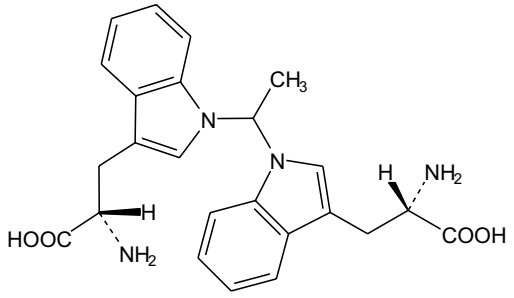
0,150 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* .

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 20,42 mg $C_{11}H_{12}N_2O_2$.

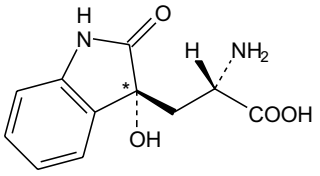
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Nečistoty

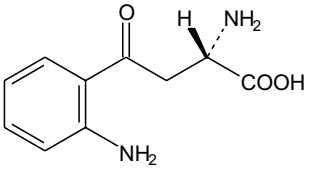


A. kyselina 3,3′-[ethylidenbis(1*H*-indol-1,3-diyl)]bis[(2*S*)-2-aminopropanová] (1,1′-ethylidenbis-tryptofan),

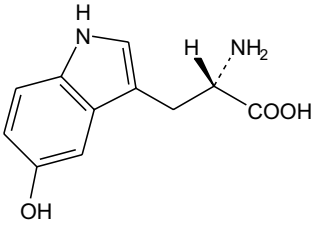


a epimer k C*

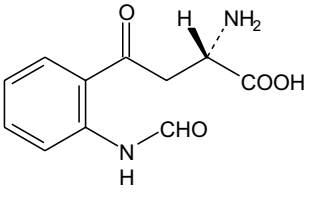
B. kyselina (*S*)-2-amino-3-[(3*RS*)-2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-1*H*-indol-3-yl]propanová (dioxyindolylalanin),



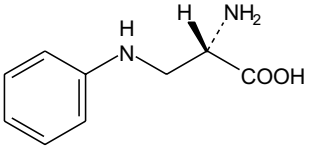
C. kyselina (*S*)-2-amino-4-(2-aminofenyl)-4-oxobutanová (kynurenin),



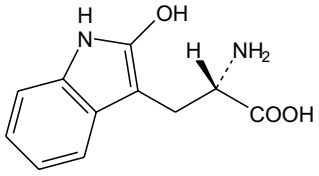
D. kyselina (*S*)-2-amino-3-(5-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)propanová (5-hydroxytryptofan),



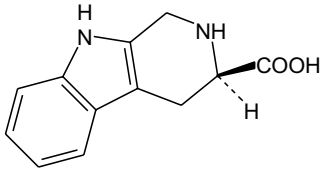
E. kyselina (*S*)-2-amino-4-[2-(formylamino)fenyl]-4-oxobutanová (N-formylkynurenin),



F. kyselina (*S*)-2-amino-3-(fenylamino)propanová (3-fenylaminoalanin),

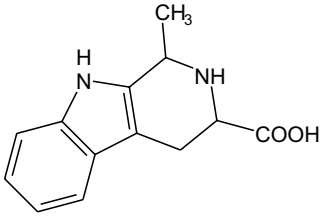


G. kyselina (*S*)-2-amino-3-(2-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)propanová (2-hydroxytryptofan),

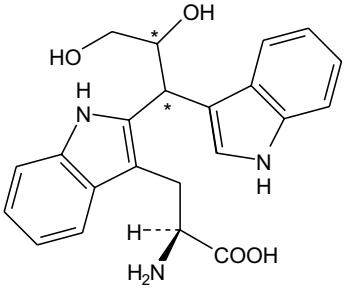


a enantiomer

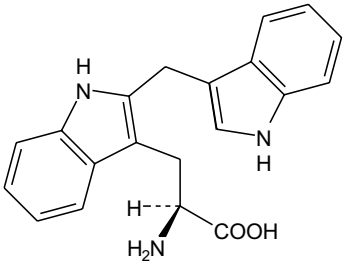
H. kyselina (3*RS*)-1,2,3,4-tetrahydro-9*H*-β-karbolin-3-karboxylová,



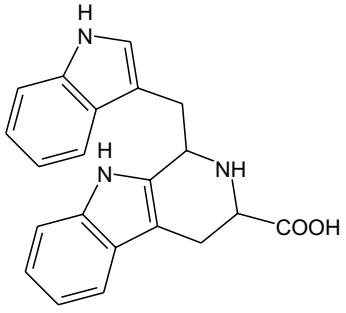
I. kyselina 1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl-9*H*-β-karbolin-3-karboxylová,



J. kyselina(*S*)-2-amino-3-{2-[2,3-dihydroxy-1-(1*H*-indol-3-yl)propyl]-1*H*-indol-3-yl}propanová,



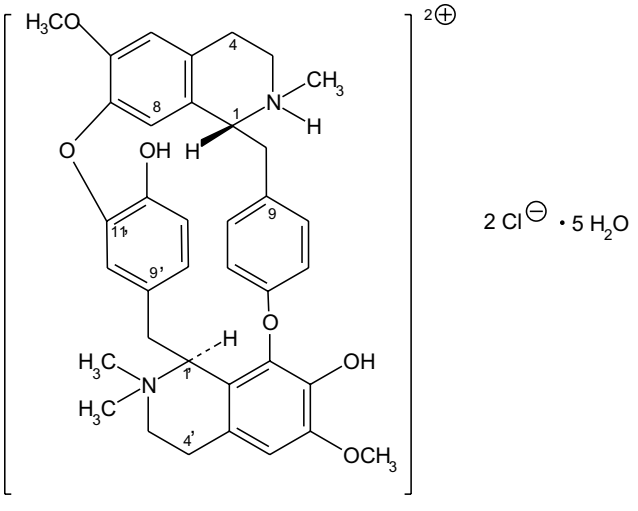
K. kyselina (*S*)-2-amino-3-[2-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1*H*-indol-3-yl]propanová,



L. kyselina 1-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydro-9*H*-β-karbolin-3-karboxylová.

†† Tubocurarini chloridum

Tubokurariniumchlorid



$C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6$. $5H_2O$ M_r 771,73 CAS 6989-98-6

M_r bezvodého 681,65

Je to pentahydrát 7′,12′-dihydroxy-6,6′-dimethoxy-2,2′,2′-trimethyltubokuraraniumdichloridu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6$.

Vlastnosti

Bílý až slabě nažloutlý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě a v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu a v etheru. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů.

Taje při asi 270 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D, E a F, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000,0 ml. Měří se absorbance tohoto roztoku při 230 nm až 350 nm *(2.2.25)*. Absorpční maximum roztoku je při 280 nm a minimum při 255 nm. Specifická absorbance v maximu je 113 až 123, počítáno na bezvodou látku.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *tubokurariniumchloridu CRL*.

C. Asi 25 mg se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidají se 0,2 ml *chloridu železitého RS2* a zahřívá se 1 min ve vodní lázni; roztok je zelený. Provede se slepá zkouška; po zahřívání ve vodní lázni je zbarvení roztoku hnědé.

D. K 1 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se přidá 1 ml *zkoumadla Millonova R;* pomalu vzniká červené zbarvení.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

F. Vyhovuje zkoušce na alkaloidy *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 0,25 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 25,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 6,0; měří se roztok S.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. + 210° až + 222°, počítáno na bezvodou látku. Měří se roztok S 3 h po jeho přípravě.

Látky rozpustné v chloroformu. 0,25 g se rozpustí ve 150 ml *vody R*. Přidá se 5 ml nasyceného roztoku *hydrogenuhličitanu sodného R* a vytřepává se třikrát 20 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové výtřepky se promyjí 10 ml *vody R*, chloroformový roztok se zfiltruje do předem zvážené kádinky a filtr se promyje dvakrát 5 ml *chloroformu R*, který se přidá k filtrátu. Odpaří se na vodní lázni do sucha a suší se 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejvýše 5 mg. Zbytek se nerozpustí v 10 ml *vody R*, ale rozpustí se po přidání 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,25 g zkoušené látky se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,5 ml zkoušeného roztoku se zředí *vodou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 µl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře spodní vrstvou směsi získané protřepáním a oddělením stejných objemových dílů *chloroformu R*, *methanolu R* a roztoku *kyseliny trichloroctové R* (125 g/l) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a postříká se směsí objemových dílů *hexakyanoželezitanu draselného RS*, *vody R* a *chloridu železitého RS1* (1 + 1 + 2) připravené v čas potřeby. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (1,5 %) a nejvýše jedna taková skvrna převyšuje intenzitou skvrnu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,75 %).

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. 9 % až 12 %; stanoví se s 0,30 g zkoušené látky.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,25 %; stanoví se s 0,200 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

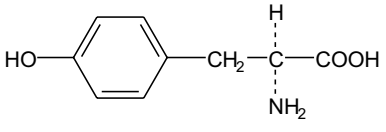
25,0 mg se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 500,0 ml. Stejným způsobem se připraví porovnávací roztok za použití 25,0 mg *tubokurariniumchloridu CRL*. Změří se absorbance *(2.2.25)* obou roztoků v maximu při 280 nm. Z naměřených absorbancí, z koncentrací roztoků a z deklarovaného obsahu bezvodého tubokurariniumchloridu v *tubokurariniumchloridu CRL* se vypočítá obsah $C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.
Venenum.

Tyrosinum

Tyrosin



$C_9H_{11}NO_3$ M_r 181,19 CAS 60-18-4

Je to kyselina (*S*)-2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)propanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_9H_{11}NO_3$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *tyrosinu CRL*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K asi 50 mg se přidá 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS;* během 15 min vznikne tmavě červené zbarvení.

E. Asi 30 mg se rozpustí ve 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS*, přidají se 3 ml čerstvě připravené směsi stejných objemových dílů roztoku *dusitanu sodného R* (100 g/l) a roztoku 0,5 g *kyseliny sulfanilové R* ve směsi 6 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* a 94 ml *vody R;* vznikne oranžově červené zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. -11,0° až -12,3°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,25 g ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a *vody R* a zředěním stejnou směsí na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *amoniaku zředěném RS2* a zředí se *vodou R* na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *tyrosinu CRL* se rozpustí v 1 ml *amoniaku zředěného RS2* a zředí se *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *tyrosinu CRL* a 10 mg *fenylalaninu CRL* se rozpustí v 1 ml *amoniaku zředěného RS2* a zředí se *vodou R* na 25 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 32% R* a *1-propanolu R* (30 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se vysuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogram porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 0,25 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny dusičné zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g) bez dalšího přidání kyseliny dusičné.

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se opatrným zahřátím rozpustí v 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou destilovanou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium *(2.4.1)*. 0,10 g vyhovuje limitní zkoušce B na amonium (200 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 0,2 ml základního *roztoku amonia (100 g NH_4/ml)*. *Oxid hořečnatý těžký R* se nahradí 2,0 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS*.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce C na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 g Pb/ml)*.

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí ve 5 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 18,12 mg $C_9H_{11}NO_3$.

Uchovávání

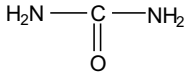
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

2860

Urea

Močovina

Synonyma. Ureum, Carbamidum



CH_4N_2O M_r 60,06 CAS 57-13-6

Je to diamid kyseliny uhličité. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny CH_4N_2O.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo průhledné krystaly. Je slabě hygroskopická, velmi snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96%, prakticky nerozpustná v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Teplota tání (*2.2.14*). 132 °C až 135 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum (*2.2.24*) tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *močoviny CRL.*

C. 0,1 g se rozpustí v 1 ml *vody R* a přidá se 1 ml *kyseliny dusičné R;* vznikne bílá krystalická sraženina.

D. 0,5 g se zahřívá ve zkumavce, až dojde ke zkapalnění a kapalina se zakalí. Po ochlazení se rozpustí ve směsi 10 ml *vody R* a 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a přidá se 0,05 ml *síranu měďnatého RS;* vzniká červenofialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 10 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. K 2,5 ml roztoku S se přidá 7,5 ml *vody R.* Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Zásaditě reagující látky. K 2,5 ml roztoku S se přidá 7,5 ml *vody R*, 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,4 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok se zbarví červeně až oranžově.

Biuret. K 10 ml roztoku S se přidá 5 ml *vody R*, 0,5 ml roztoku *síranu měďnatého R* (5 g/l), 0,5 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a nechá se 5 min stát. Vzniklé červenofialové zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení kontrolního roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 10 ml roztoku *biuretu R* (0,2 g/l) (0,1 %).

Amonium (*2.4.1*). 0,1 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce na amonium (500 μg/g).

Těžké kovy (*2.4.8*). 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 20 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (10 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití základního *roztoku olova (1 μg Pb/ml).*

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 1 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,0 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v roztoku *kyseliny sírové R* 10% (*V/V*) a zředí se jím na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se převede do spalovací baňky s dlouhým hrdlem, přidá se 10 ml *kyseliny sírové R* a mírně se zahřívá, dokud se delší dobu nevyvíjí plyn. Vaří se mírně 10 min, ochladí se, opatrně se přidá 40 ml *vody R*, znovu se ochladí a převede se do přístroje na destilaci s vodní parou. Přidá se 50 ml *hydroxidu sodného koncentrovaného RS* a směs se ihned destiluje s vodní parou po dobu 1 h. Asi 50 ml destilátu se jímá do 40 ml roztoku *kyseliny borité R* (40 g/l), přidá se 0,25 ml *červeně methylové směsného indikátoru RS* a titruje se *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS*. Současně se provede slepá zkouška.

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,003 mg CH_4N_2O.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

† Urofollitropinum

Urofolitropin

Je to suchý přípravek obsahující menopauzální gonadotropin získaný z moči postmenopauzálních žen. Má folikulostimulující účinek a žádnou nebo téměř žádnou luteinizační účinnost. Účinnost je nejméně 90 m.j. folikulostimulujícího hormonu (hFSH) v miligramu. Poměr jednotek luteinizačního hormonu (hLH) (hormonu stimulujícího intersticiální buňky - ICSH) k jednotkám folikulostimulujícího hormonu je nejvýše 1/60.

Výroba

Připravuje se vhodným frakcionačním postupem s následnou imunoafinitní chromatografií za podmínek, které snižují na nejnižší míru mikrobiální kontaminaci. Výrobní postup prokazatelně omezuje jakoukoliv kontaminaci viry, jako je virus hepatitidy nebo HIV, vhodnými validovanými metodami.

Vlastnosti

Téměř bílý nebo slabě nažloutlý prášek. Je rozpustný ve vodě.

Zkouška totožnosti

Podá-li se infantilním samicím potkana, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, vyvolá zvýšení hmotnosti vaječníků.

Zkoušky na čistotu

Antigeny virové hepatitidy. Při vyšetření vhodně citlivou imunochemickou metodou (*2.7.1*) se nezjistí antigeny virové hepatitidy.

Antigen HIV. Při vyšetření vhodně citlivou imunochemickou metodou (*2.7.1)* se nezjistí antigen HIV.

Reziduální luteinizační účinnost. Mezinárodní jednotka FSH a LH jsou účinnosti obsažené v deklarovaném množství mezinárodního standardu lidského močového folikulostimulujícího hormonu a luteinizačního hormonu (tj. hormonu stimulujícího intersticiální buňky), který sestává ze směsi extraktu z moči postmenopauzálních žen a laktosy. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace. Ke zkoušce se vyberou nedospělé samice potkana ve stáří přibližně 21 dní, u nichž rozdíl hmotnosti mezi největším a nejmenším zvířetem je nejvýše 10 g. Zvířata se náhodně rozdělí do čtyř stejných skupin po nejméně šesti jedincích. Jsou-li dosažitelné čtyři samice z jednoho vrhu, rozdělí se po jedné do každé skupiny a označí se.

V předběžné zkoušce se zvolí tři vhodné dávky referenční látky tak, aby nejnižší dávka vyvolala snížení obsahu kyseliny askorbové ve vaječnících všech zvířat a nejvyšší dávka submaximální odpověď u všech zvířat. Použijí se dávky v geometrické řadě a jako první pokus se doporučují dávky 0,5 m.j., 1,0 m.j. a 2,0 m.j., avšak konečné dávkování závisí na citlivosti zvířat. Zvolí se dávka zkoušeného přípravku s předpokladem, že obsahuje 60*X* m.j. folikulostimulujícího hormonu (hFSH), kde *X* = počet m.j. hLH obsažených v prostřední z trojice dávek referenční látky. Referenční látka i zkoušený přípravek se rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnano-albuminovém o pH 7,2* tak, aby zvolené dávky referenční látky i zkoušeného přípravku byly obsaženy v objemu 1,0 ml.

Pro vlastní zkoušku se celý soubor zvířat připraví tím, že se všem infantilním samicím vstříkne podkožně první den 50 m.j. *gonadotropinu séra R* a čtvrtý den 25 m.j. *gonadotropinu choriového R* (oba v 0,5 ml *tlumivého roztoku fosforečnano-albuminového o pH 7,2*). Desátý den se třem skupinám infantilních samic vstříkne do ocasní žíly referenční látka (každé skupině jiná dávka) a čtvrté skupině dávka zkoušeného přípravku. Přesně za 4 h poté se zvířata usmrtí. U každé samice se vypreparují oba vaječníky, očistí od cizí tekutiny a tkáně a ihned se zváží. Oba vaječníky od každého zvířete zvlášť se zpracují takto: vaječníky se rozdrtí a 2 min se homogenizují v čerstvě připraveném roztoku *kyseliny metafosforečné R* (25 g/l) při 4 °C a homogenát se týmž roztokem zředí na 7 ml. Nechá se 30 min stát při 4 °C a odstředí se při 2500 g. Je-li třeba, supernatantní tekutina se zfiltruje 0,22 μm filtrem.

Připraví se čerstvý roztok sestávající ze směsi 2 ml roztoku *octanu sodného R* (45,3 g/l), jehož pH bylo upraveno přidáním *kyseliny octové R* na 7, 3 ml *vody R* a 2 ml standardizovaného *2,6-dichlorfenolindofenolu RS*. Smíchají se 2 ml tohoto roztoku se 2 ml čiré supernatantní tekutiny. Za 30 s po smíchání se měří absorbance (*2.2.25*) v maximu při asi 520 nm.

Množství kyseliny askorbové se odečte z kalibrační křivky, která se sestrojí stejným postupem z vhodných koncentrací *kyseliny askorbové CRL* rozpuštěné v roztoku *kyseliny metafosforečné R* (25 g/l). Výsledky se vyjádří jako obsah kyseliny askorbové v mg na 0,1 g hmotnosti vaječníků pro každou samici.

Stanoví se průměr obsahu kyseliny askorbové ve vaječnících samic po dávce zkoušeného přípravku a jeho odchylka. Pro každou skupinu dávek referenční látky se nanese průměrný obsah kyseliny askorbové ve vaječnících jako funkce logaritmu dávky a za použití standardních analytických metod (metoda nejmenších čtverců) se zjišťuje úbytek obsahu kyseliny askorbové na logaritmu podané dávky. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže:

- stálý sklon *b* je významný na 5% hladině významnosti,
- pro skupiny ošetřené referenční látkou se součet čtverců vzhledem k lineární regresi rovná 95 % celkového součtu čtverců obsahu kyseliny askorbové,
- vnitroskupinový rozptyl obsahu kyseliny askorbové ve skupině ošetřené zkoušeným přípravkem se významně neliší na 5% hladině významnosti od vnitroskupinového rozptylu obsahu kyseliny askorbové ve skupinách ošetřených referenční látkou.

Průměr obsahu kyseliny askorbové ve vaječnících potkanů ošetřených zkoušeným přípravkem není významně nižší než průměr obsahu kyseliny askorbové ve vaječnících potkanů ošetřených střední dávkou referenční látky (počítáno z regresní rovnice) na 5% hladině významnosti.

Voda. Nejvýše 5,0 %; stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu. *Použije se suché sklo (může být silikonované).*

Roztok vnitřního standardu. 15 μl *methanolu bezvodého R* se zředí *2-propanolem R1* na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 4 mg se rozpustí v 0,5 ml *2-propanolu R1*.
Zkoušený roztok (b). 4 mg se rozpustí v 0,5 ml roztoku vnitřního standardu.
Porovnávací roztok. 10 μl *vody R* se přidá k 50 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen kopolymerem R* (180 μm až 250 μm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- teplotně vodivostního detektoru.

Teplota kolony je 120 °C a detektoru 150 °C.

Nastříknou se zvolené objemy všech roztoků. Vypočítá se obsah vody za předpokladu, že její hustota (*2.2.5*) při 20 °C je 0,9972 g/ml, přičemž se bere v úvahu voda zjistitelná v roztoku vnitřního standardu.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně množství odpovídající 5 m.j. folikulostimulujícího hormonu rozpuštěné v nejvýše 1 ml sterilního apyrogenního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

Stanovení účinnosti

Účinnost látky se stanoví v daných podmínkách porovnáním jejího účinku na zvýšení hmotnosti vaječníků infantilních samic potkana ošetřených choriovým gonadotropinem se stejným účinkem mezinárodního standardu lidského močového folikulostimulujícího a luteinizačního hormonu nebo referenční látky kalibrované v mezinárodních jednotkách. Mezinárodní jednotka FSH a LH je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu lidského močového folikulostimulujícího hormonu a luteinizačního (tj. hormonu stimulujícího intersticiální buňky), kterým je směs lyofilizovaného extraktu z moči postmenopauzálních žen s laktosou. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Ke stanovení se vyberou infantilní samice potkana z jednoho kmene ve stáří 19 až 28 dní, u nichž věkový rozdíl je nejvýše 3 dny a rozdíl hmotnosti mezi nejtěžším a nejlehčím zvířetem je nejvýše 10 g. Zvířata se náhodně rozdělí do šesti stejných skupin po nejméně pěti jedincích. Je-li dosažitelných šest samic z jednoho vrhu, rozdělí se po jedné do každé skupiny a označí se.

Zvolí se tři dávky referenční látky a tři dávky zkoušeného přípravku tak, aby nejnižší dávka vyvolala určitou měřitelnou reakci u části zvířat ve skupině a nejvyšší dávka submaximální odpověď u celé skupiny. Použijí se dávky v geometrické řadě a jako první pokus se doporučují celkové dávky 1,5 m.j., 3,0 m.j. a 6,0 m.j., avšak konečné dávkování závisí na citlivosti zvířat, která může značně kolísat.

Celková množství referenční látky a zkoušeného přípravku, která odpovídají denní dávce pro jednotlivé dávkové kategorie, se odděleně rozpustí v *tlumivém roztoku fosforečnano-albuminovém o pH 7,2* tak, aby denní dávka byla obsažena v objemu přibližně 0,5 ml. Tlumivý roztok obsahuje

v denní dávce nejméně 14 m.j. choriogonadotropinu, aby se zajistila úplná luteinizace. Přidá se vhodná konzervační látka, jako např. fenol (4 g/l) nebo thiomersal (0,02 g/l). Takto připravená tři ředění referenční látky a tři ředění zkoušeného přípravku se uchovávají při teplotě (5 ± 3) °C.

Při vlastním stanovení se třem skupinám infantilních samic vstříkne podkožně denní dávka roztoku referenční látky a třem skupinám roztoku zkoušeného přípravku (každé skupině jiné ředění) a podání se opakuje za 24 h a 48 h. Za 24 h od poslední injekce se samice usmrtí. Vypreparují se oba vaječníky, rychle se očistí od cizí tekutiny a tkáně, osuší a společně zváží. Průměrná hmotnost vaječníků v jednotlivých dávkových kategoriích je podkladem pro výpočet účinnosti za použití běžných statistických metod (*5.3.3.2*). Přesnost hodnocení výsledků je možno zvýšit vhodným přepočtem hmotnosti orgánů na celkovou tělesnou hmotnost příslušného zvířete a použít analýzu kovariance.

Stanovená účinnost přípravku je v rozmezí 80 % až 125 % účinnosti deklarované. Interval spolehlivosti (P = 0,95) účinnosti stanovené je v rozmezí 65 % až 156 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Ve vzduchotěsném zabezpečeném obalu, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost folikulostimulujícího hormonu v obalu vyjádřená v mezinárodních jednotkách,
- účinnost folikulostimulujícího hormonu v miligramu vyjádřená v mezinárodních jednotkách,
- zda je látka sterilní.

† Urokinasum

Urokinasa

CAS 9039-53-6

Je to enzym získaný z lidské moči, který aktivuje plazminogen. Skládá se ze směsi nízkomolekulárních (M_r 33 000) a vysokomolekulárních (M_r 54 000) forem, přičemž vysokomolekulární forma převažuje. Účinnost je nejméně 70 000 mezinárodních jednotek v miligramu bílkoviny.

Výroba

Připravuje se validovanými výrobními postupy, které omezují nebo vylučují kontaminaci mikroby a viry a vazoaktivními látkami. Zvláště k inaktivaci virů se užívají přiměřené postupy, jako je zahřívání roztoku látky na 60 °C po dobu 10 h.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý amorfní prášek. Je rozpustná ve vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Do dvou hemolytických zkumavek se napipetuje odděleně po 0,5 ml citrátové lidské plazmy a 0,5 ml citrátové hovězí plazmy a zahřívá se ve vodní lázni při 37 °C. Do každé zkumavky se přidá 0,1 ml roztoku zkoušené látky v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,4* (1000 m.j./ml) a 0,1 ml roztoku *thrombinu lidského R* (20 m.j./ml) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,4* a ihned se zamíchá. V obou zkumavkách se tvoří sraženina, která se rozpustí během 30 min.

B. Provede se zkouška totožnosti vhodnou imunodifuzní metodou.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 10 mg se rozpustí v 10 ml *vody R*. Roztok je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Povrchový antigen hepatitidy B. Zkouší se vhodnou citlivou metodou, jako je radioimunoanalýza. Povrchový antigen hepatitidy B se neprokáže.

Tromboplastické nečistoty.

Zkoušené roztoky. Vhodné množství zkoušené látky se rozpustí v *tlumivém roztoku barbitalovém o pH 7,4* tak, aby získané roztoky měly účinnost 5000 m.j., 2500 m.j., 1250 m.j., 625 m.j. a 312 m.j. v mililitru.

Do každé ze šesti hemolytických zkumavek o vnitřním průměru 1 cm se odměří 0,1 ml *citrátové králičí plazmy R*. Zkoušené roztoky se po 0,1 ml přidají do každé z pěti zkumavek a do šesté zkumavky se přidá 0,1 ml *tlumivého roztoku barbitalového o pH 7,4* (slepá zkouška). Zkumavky se inkubují 5 min při (25 ± 0,5) °C a pak se přidá 0,1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (3,675 g/l). Stopkami se změří koagulační čas pro každou zkumavku. Do grafu se vynáší zkracování rekalcifikačního času (rozdíl srážecího času slepé zkoušky a srážecího času měřeného vzorku) proti logaritmu koncentrace v mezinárodních jednotkách. Pěti vynesenými body se proloží přímka a extrapoluje se k nulovému rekalcifikačnímu času.

Urokinasová účinnost v průsečíku, který představuje limitní koncentraci pro koagulační aktivitu (nulová koagulační aktivita), je nejméně 150 m.j. v mililitru.

Molekulová frakce. Zkouší se vylučovací chromatografií (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. Asi 1 mg zkoušené látky se rozpustí v 1,0 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 8,0 (0,02 mol/l)*. Připravuje se těsně před použitím.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm naplněné *dextranem pro chromatografii síťovaným R3*,
- mobilní fáze, kterou je roztok *chloridu sodného R* (17,5 g/l) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 8,0 (0,02 mol/l)*, s průtokovou rychlostí 6 ml/h.

Po ustálení kolony při 5 °C se převede zkoušený roztok do vstupu kolony a zbytky vzorku se spláchnou dvakrát 0,5 ml mobilní fáze a provede se eluce. Eluát se jímá po částech o objemu 1 ml, měří se absorbance (*2.2.25*) eluátů v maximu při 280 nm a jednotlivé hodnoty se zakreslí do grafu. Spustí se kolmice k osám přímek z minima před vrcholem vysokomolekulární formy, mezi vrcholy obou forem a za vrcholem nízkomolekulární formy a takto se identifikují frakce, které jsou uvažovány ve výpočtu poměru účinnosti obou forem. Spojí se zvlášť frakce vysokomolekulární formy a zvlášť frakce nízkomolekulární formy. Odděleně se stanoví urokinasová účinnost v mezinárodních jednotkách pro každou spojenou frakci, a to metodou popsanou v odstavci Stanovení

účinnosti. Poměr urokinasové účinnosti spojených frakcí vysokomolekulární formy k účinnosti spojených frakcí nízkomolekulární formy je nejméně 2,0.

Celková bílkovina. Stanoví se obsah dusíku mineralizací 10 mg zkoušené látky kyselinou sírovou (*2.5.9*) a celkový obsah bílkoviny se vypočítá vynásobením faktorem 6,25.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího pyrogenní látky, vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje na 1 kg hmotnosti králíka 1,0 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího množství zkoušené látky odpovídající 20 000 m.j./ml.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním schopnosti zkoušené látky aktivovat plazminogen k tvorbě plazminu se stejnou schopností referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách. Tvorba plazminu se měří stanovením doby rozpouštění fibrinové sraženiny za daných podmínek.

Mezinárodní jednotkou je účinnost obsažená v určitém množství mezinárodního referenčního přípravku, kterým je lyofilizovaná urokinasa s laktosou. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Pokud není uvedeno jinak, použije se pro přípravu roztoků a ředění použitých v tomto stanovení roztok albuminu hovězího R (30 g/l) v tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,4.

Zkoušený roztok. Připraví se roztok zkoušené látky tak, aby jeho předpokládaná účinnost byla asi 1000 m.j./ml.

Porovnávací roztok. Připraví se roztok referenčního přípravku tak, aby jeho účinnost byla 1000 m.j./ml.

Zkoušený a porovnávací roztok se uchovávají v ledové lázni a lze je použít do 6 h od přípravy. Připraví se tři 1,5násobná ředění porovnávacího roztoku tak, aby nejdelší doba rozpouštění sraženiny byla nejvýše 20 min a nejkratší doba nejméně 3 min. Dále se připraví 3 vzorky zkoušeného roztoku s podobným ředěním. Připravené roztoky se uchovávají v ledové lázni a použijí se do 1 h. Připraví se 24 zkumavek o průměru 8 mm. Zkumavky se označí T_1, T_2 a T_3 pro ředění zkoušeného roztoku a S_1, S_2 a S_3 pro ředění porovnávacího vzorku, přičemž se použijí 4 zkumavky pro každé ředění. Do každé ze zkumavek umístěných v ledové lázni se pipetuje 0,2 ml příslušného ředění, 0,2 ml roztoku *albuminu hovězího R* (30 g/l) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH 7,4* a 0,1 ml roztoku *trombinu lidského R* o účinnosti nejméně 20 m.j./ml. Zkumavky se poté umístí do vodní lázně o teplotě 37 °C a inkubují se 2 min k vyrovnání teploty. Pomocí automatické pipety se pipetuje na dno 1. zkumavky 0,5 ml roztoku *euglobulinů hovězích R* (10 g/l) a obsah se promíchá. V intervalech 5 s se do zbylých zkumavek pipetuje po 0,5 ml roztoku *hovězích euglobulinů R* (10 g/l). Stopkami se měří čas v sekundách pro každou zkumavku mezi přidáním roztoků euglobulinů a rozpuštěním sraženiny. Do grafu se vynáší logaritmus rozpouštěcího času pro zkoušenou látku a pro referenční přípravek proti logaritmu koncentrace. Pomocí běžných statistických metod se vypočítá účinnost zkoušené látky. Stanovená účinnost je 90 % až 111% deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) je 80 % až 125 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

V dobře uzavřeném obalu, chráněna před světlem, při teplotě nepřesahující 8 °C. Pokud je látka sterilní, uchovává se ve sterilním vzduchotěsném zabezpečeném obalu.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v mezinárodních jednotkách v miligramu bílkoviny,
- zda je obsah sterilní,
- zda je obsah prostý pyrogenních látek.

Uvae ursi folium

Medvědicový list

Synonymum. Folium uvae ursi

Je to celý nebo řezaný usušený list druhu *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) SPRENG. Obsahuje nejméně 8,0 % hydrochinonových derivátů, počítáno jako bezvodý arbutin ($C_{12}H_{16}O_7$; M_r 272,3), vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. List lesklý, na svrchní straně tmavě zelený, na spodní straně světlejší, zpravidla 7 mm až 30 mm dlouhý a 5 mm až 12 mm široký, je opakvejčitý, celokrajný s hladkou často podvinutou čepelí, na bázi zúženou v krátký řapík. List na vrcholku tupý nebo zašpičatělý, čepel tlustá, kožovitá. Žilnatina zpeřená, jemně síťovitá, dobře patrná na obou stranách listu. Svrchní strana lesklá, s vpadlou žilnatinou tvořící charakteristický zrnitý vzhled. Jen mladý list na okraji brvitý, starší listy lysé.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je zelený až zelenošedý nebo žlutozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky při plošném pozorování s mnohohrannými buňkami, krytými silnou hladkou kutikulou s přímými ztlustlými nepravidelně tečkovanými stěnami; anomocytické průduchy (*2.8.3*) jsou obklopeny pěti až jedenácti vedlejšími buňkami, jizvy bází chlupů patrné jen na spodní straně listu; úlomky palisádového parenchymu se třemi až čtyřmi vrstvami buněk nestejné délky; houbový parenchym; skupiny zdřevnatělých vláken pericyklu s řadami buněk obsahujících hranolovité krystaly šťavelanu vápenatého, občas kuželovité, jednobuněčné krycí chlupy.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,5 g práškované drogy (355) se smíchá s 5 ml směsi stejných objemových dílů *methanolu R* a *vody R* a zahřívá se 10 min pod zpětným chladičem. Ještě horký roztok se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí výše uvedenou směsí a zředí se jí na 5 ml.

Porovnávací roztok. 25 mg *arbutinu R*, 25 mg *kyseliny gallové R* a 25 mg *hydrochinonu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10,0 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 10 μl porovnávacího roztoku a 20 μl zkoušeného roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (6 + 6 + 88) po dráze 15 cm. Suší se při 105 °C až 110 °C do vymizení zápachu kyseliny mravenčí. Postříká se roztokem *dichlorchinonchlorimidu R* (10 g/l) v *methanolu R* a pak roztokem *uhličitanu sodného bezvodého R* (20 g/l). Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou patrné skvrny odpovídající polohou a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (v dolní třetině světle modrý pruh odpovídající arbutinu, v horní třetině dva pruhy, nahnědlý odpovídající kyselině gallové a modrý odpovídající hydrochinonu). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další dva až tři modré pruhy a několik hnědých nebo hnědošedých pruhů.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Nejvýše 8 %, z čehož je nejvýše 5 % stonků a nejvýše 3 % cizích organických příměsí.

Jinak zbarvená droga. Nejvýše 10 %; provede se způsobem uvedeným ve zkoušce Cizí příměsi *(2.8.2)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 10,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 5,0 %.

Stanovení obsahu

0,400 g práškované drogy (250) se v baňce se zábrusem na 250 ml smíchá s 50 ml *vody R* a vaří se 30 min pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zředí *vodou R* na 250,0 ml. Po usazení částic se 5,0 ml roztoku převede do dělicí nálevky, postupně se přidá a po každém přidání se promíchá: 45 ml *vody R*, 1,0 ml roztoku *aminopyrazolonu R* (20 g/l), 0,5 ml *amoniaku zředěného RS2* a 1,0 ml roztoku *hexakyanoželezitanu draselného R* (80 g/l). Nechá se stát 5 min a pak se protřepe 25 ml *dichlormethanu R*. Dichlormethanová vrstva se zfiltruje chomáčkem vaty povhlčeným *dichlormethanem R* do odměrné baňky na 100 ml. Vodná vrstva se protřepává třikrát 25 ml *dichlormethanu R* a spojené výtřepky se zředí *dichlormethanem R* na 100,0 ml. Změří se absorbance *(2.2.25)* roztoku v maximu při 455 nm za použití *vody R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se obsah hydrochinonových derivátů v procentech, počítáno jako bezvodý arbutin, podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 7{,}716}{m} \ ,$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 455 nm,
m - navážku drogy v gramech,

Specifická absorbance bezvodého arbutinu je 648.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

2870

Valerianae radix

1998

Kozlíkový kořen

Synonymum. Radix valerianae

Jsou to celé usušené oddenky, kořeny a výběžky nebo jejich úlomky druhu *Valeriana officinalis* L. sensu lato.

Obsahuje nejméně 5 ml silice v 1 kilogramu celé drogy a nejméně 3 ml silice v 1 kilogramu řezané drogy, obojí vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Droga je žlutošedá až světle hnědošedá. Oddenek opakvejčitý až kuželovitý, až 50 mm dlouhý a až 30 mm široký. Bazální část je prodloužená nebo zploštělá, zpravidla pokrytá četnými splývajícími kořeny. Na vrcholu je obyčejně jamkovitá jizva po nadzemní části rostliny; zbytek stonku bývá přítomen jen zřídka. Na podélném řezu je patrna dřeň s centrální dutinou, s přehrádkami. Četné, převážně kuželovité kořeny o průměru 1 mm až 3 mm jsou většinou více než 100 mm dlouhé, mají stejnou barvu jako oddenek. Vláknité postranní kořínky jsou lámavé a nepříliš početné. Lom krátký. Výběžky jsou charakteristické nápadnými uzlinami oddělenými podélně rýhovanými internodii 20 mm až 50 mm dlouhými a vláknitým lomem.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je světle žlutošedý až světle šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: buňky obsahující světle hnědou pryskyřici nebo kapky silice; jednotlivé sklereidy s pravoúhlými tečkovanými stěnami 5 μm až 15 μm silnými; síťovitě ztlustlé cévy dřeva; zřídka úlomky korku a úlomky pokožky, někdy s kořenovými vlásky.

Pozoruje se pod mikroskopem v roztoku *glycerolu R* 50% *(V/V)*. Jsou patrné četné úlomky parenchymu obsahující jednoduchá nebo složená škrobová zrna; jednoduchá škrobová zrna jsou kulovitá nebo protáhlá o průměru 5 μm až 15 μm, někdy se štěrbinovitou nebo paprsčitou trhlinou; složená škrobová zrna jsou dvoučetná až šestičetná o celkovém průměru až 20 μm.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok. 1,0 g práškované drogy (355) se v 25ml baňce smíchá s 6,0 ml *methanolu R* a 15 min se protřepává, pak se zfiltruje. Baňka i filtr se promyjí malým množstvím *methanolu R* tak, aby konečný objem filtrátu činil 5 ml. Filtrát se odpaří na asi 2 ml a smíchá se se 3 ml roztoku *hydroxidu draselného R* (100 g/l). Protřepe se dvakrát 5 ml *dichlormethanu R*. Spodní vrstva se vždy odstraní. Vodná vrstva se zahřívá 10 min ve vodní lázni při 40 °C. Po ochlazení se smíchá s *kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS* až do kyselé reakce roztoku. Protřepe se dvakrát 5 ml *dichlormethanu R*. Spojené spodní vrstvy se zfiltrují přes *síran sodný bezvodý R*. Filtrát se odpaří do sucha; zbytek se rozpustí v 1,0 ml *dichlormethanu R*.

Porovnávací roztok. 5 mg *fluoresceinu R* a 5 mg *červeně sudanové G R* se rozpustí v 10,0 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 20 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *ethylacetatu R* a *hexanu R* (0,5 + 35 + 65) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je ve střední části červená skvrna (červeň sudanová), ve spodní části zelenožlutá skvrna (fluorescein). Vrstva se postříká *anisaldehydem RS* a suší se 5 min až 10 min při 100 °C až 105 °C; pozoruje se v denním světle. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je fialově modrá skvrna (kyselina hydroxyvalerenová) přibližně odpovídající polohou skvrně fluoresceinu na chromatogramu porovnávacího roztoku a fialová skvrna (kyselina valerenová) přibližně odpovídající polohou skvrně červeně sudanové na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku jsou v horní polovině další, většinou méně intenzivní růžové až fialové skvrny.

Zkoušky na čistotu

Extraktivní látky. 2,00 g práškované drogy (355) se smíchá se směsí složenou z 8 g *vody R* a 12 g *lihu 96% R*, za častého protřepávání se nechá 2 h stát a pak se zfiltruje. 5 g filtrátu se odpaří do sucha na vodní lázni při 100 °C až 105 °C. Zbytek váží nejméně 0,1 g (20,0 %).

Cizí příměsi *(2.8.2)*. Nejvýše 5 % zbytků stonků a nejvýše 2 % ostatních cizích příměsí.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 12,0 %; 1,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 12,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové *(2.8.1)*. Nejvýše 5,0 %.

Stanovení obsahu

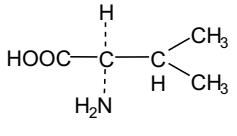
Provede se Stanovení silic v rostlinných drogách *(2.8.12)*. 40,0 g čerstvě práškované drogy (500) se destiluje 4 h rychlostí 3 ml/min až 4 ml/min v baňce na 2000 ml s 500 ml *vody R;* do dělené trubice se přidá 0,50 ml *xylenu R.*

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Valinum

Valin



$C_5H_{11}NO_2$ M_r 117,15 CAS 72-18-4

Je to kyselina *(S)*-2-amino-3-methylbutanová. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_5H_{11}NO_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je dobře rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. Zkouška Specifická optická otáčivost, viz Zkoušky na čistotu, je zároveň zkouškou totožnosti.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *valinu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Látky reagující s ninhydrinem, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_6$ *(2.2.2, Metoda II).*

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +26,5° až +29,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se roztok připravený rozpuštěním 2,00 g v *kyselině chlorovodíkové RS* a zředěním stejnou kyselinou na 25,0 ml.

Látky reagující s ninhydrinem. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,10 g se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *valinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *vodou R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *fenylalaninu CRL* a 10 mg *valinu CRL* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 25 ml.

Na vrstvu se nanese po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *1-butanolu R* (20 + 20 + 60) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *ninhydrinem RS* a zahřívá se 15 min při 100 °C až 105 °C. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou dvě zřetelně oddělené skvrny.

Chloridy *(2.4.4)*. 10 ml roztoku S se zředí *vodou R* na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (200 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 0,5 g se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 15 ml. Tento roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (300 μg/g).

Amonium. Připraví se dvě hodinová sklíčka o průměru 60 mm, která lze k sobě přiklopit. Na vnitřní stěnu horního sklíčka se přilepí čtvereček *papíru lakmusového červeného R* o straně 5 mm

a navlhčí se několika kapkami *vody R*. 50 mg upráškované zkoušené látky se umístí na spodní sklíčko a rozpustí se nebo suspenduje v 0,5 ml *vody R*. K roztoku nebo k suspenzi se přidá 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* a rychle se zamíchá skleněnou tyčinkou. Sklíčko s lakmusovým papírem se přiklopí na sklíčko se zkoušenou látkou a zahřívá 15 min při 40 °C. Lakmusový papír není intenzivněji modře zbarven než porovnávací vzorek připravený současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku amonia (100 μg NH_4/ml)*, 0,5 ml *vody R* a 0,30 g *oxidu hořečnatého těžkého R* (200 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 1,0 g se rozpustí v dělicí nálevce v 10 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a vytřepává se třikrát po 3 min vždy s 10 ml *isobutylmethylketonu R1*. Ke spojeným organickým vrstvám se přidá 10 ml *vody R* a třepe se 3 min. Vodná vrstva vyhovuje limitní zkoušce na železo (10 μg/g).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 2,0 g vyhovují limitní zkoušce D na těžké kovy (10 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2,0 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,100 g se rozpustí ve 3 ml *kyseliny mravenčí bezvodé R*, přidá se 30 ml *kyseliny octové bezvodé R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za použití 0,1 ml *naftolbenzeinu RS* jako indikátoru do změny hnědožlutého zbarvení na zelené.

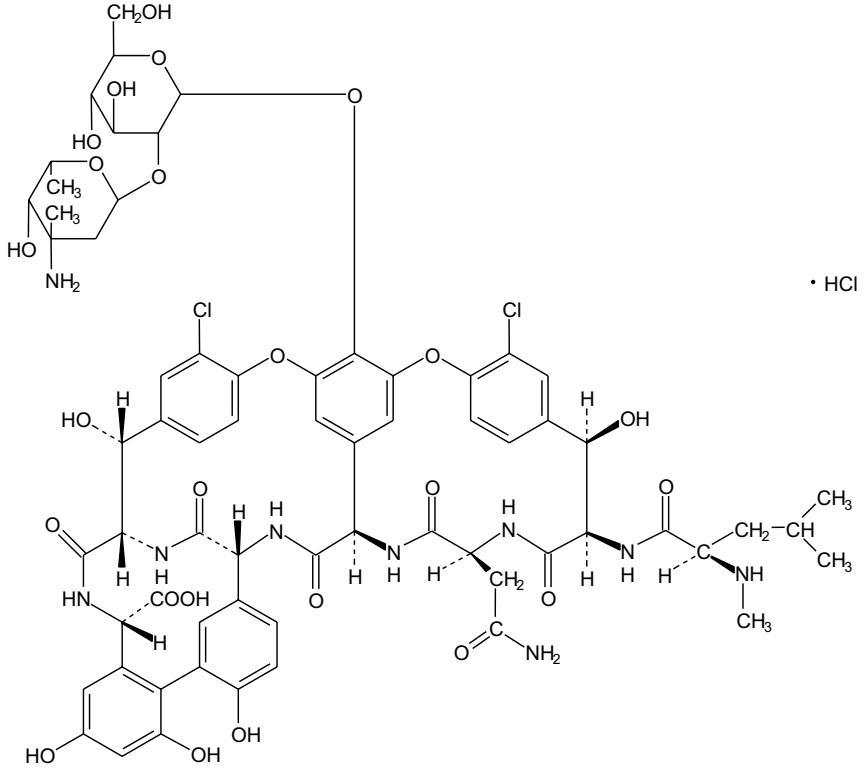
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 11,71 mg $C_5H_{11}NO_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

† Vancomycini hydrochloridum

Vankomyciniumchlorid



$C_{66}H_{76}Cl_3N_9O_{24}$ M_r 1485,73 CAS 1404-93-9

Je to hydrochlorid směsi příbuzných glykopeptidů obsahující hlavně monohydrochlorid kyseliny (S_a)-(3*S*,6*R*,7*R*,22*R*,23*S*,26*S*,36*R*,38a*R*)-44-{[2-O-(3-amino-2,3,6-trideoxy-3-C-methyl-α-L-*lyxo*-hexopyranosyl)-ß-D-glukopyranosyl]oxy}-22*H*-8,11:18,21-dietheno-2,3,4,5,6,7,23,24,25,26,36,37,38,38a--tetradekahydro-7,22,28,30,32-pentahydroxy-10,19-dichlor-23,36-(iminomethano)-3-(karbamoyl-methyl)-13,16:31,35-dimetheno-6-[(2*R*)-4-methyl-2-(methylamino)valeramido]-2,5,24,38,39--pentaoxo-1*H*,16*H*[1,6,9]oxadiazacyklohexadecino[4,5-*m*]-[10,2,16]-benzoxadiazacyklotetrakosin-26--karboxylové (vankomycin B). Látka je produkována určitými kmeny mikroorganismu *Amycolatopsis orientalis* nebo se získává jinými způsoby. Účinnost je nejméně 1050 m.j. v miligramu, počítáno na bezvodou látku.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Hodnotí se chromatogram ze zkoušky Vankomycin B, viz Zkoušky na čistotu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) je shodný s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

B. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 2,50 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25,0 ml. Roztok je čirý (*2.2.1*) a jeho absorbance (*2.2.25*) měřená při 450 nm není vyšší než 0,10.

Hodnota pH (*2.2.3*). 2,5 až 4,5. Měří se následující roztok: 0,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vankomycin B. Nejméně 93,0 %. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). 10,0 mg zkoušené látky se rozpustí v mobilní fázi A a zředí se jí na 5,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 2,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází A na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (c). 0,5 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí mobilní fází A na 20,0 ml.
Porovnávací roztok. 5 mg *vankomyciniumchloridu CRL* se rozpustí ve 4 ml *vody R* a zředí se jí na 10 ml. 24 h se zahřívá na 65 °C a nechá se zchladnout.

Roztoky se použijí do 4 h od přípravy.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilních fází s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min a následujících složení:
  - *mobilní fáze A* - k 4 ml *triethylaminu R* se přidá 1996 ml *vody R* a pH se upraví na 3,2 *kyselinou fosforečnou R;* k 920 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *tetrahydrofuranu R* a 70 ml *acetonitrilu R*,
  - *mobilní fáze B* - ke 4 ml *triethylaminu R* se přidá 1996 ml *vody R* a pH se upraví na 3,2 *kyselinou fosforečnou R*; k 700 ml tohoto roztoku se přidá 10 ml *tetrahydrofuranu R* a 290 ml *acetonitrilu R*,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm,
- injektorové smyčky, 20 μl.

Chromatogramy se zaznamenávají za následujících podmínek. Nejprve se kolona promývá mobilní fází A. Po 13 min se použije gradientová eluce a koncentrace mobilní fáze B se zvyšuje o 11 % (*V/V*)/min. Nakonec se 4 min promývá mobilní fází B.

Nastříkne se zkoušený roztok (c). Zkoušku lze hodnotit, jestliže poměr signálu hlavního píku na chromatogramu tohoto roztoku k šumu není menší než 5. Nastříkne se zkoušený roztok (b). Zkoušku lze hodnotit, jestliže faktor symetrie píku vankomycinu je nejvýše 1,6. Nastříkne se porovnávací roztok. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi dvěma hlavními píky je alespoň 5,0. Nastříkne se zkoušený roztok (a).

Obsah vankomyciniumchloridu B v procentech se vypočte ze vzorce:

$$\frac{A_b \cdot 100}{A_b + (A_t/25)},$$

v němž značí:
A_b - plochu píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídajícího vankomycinu B,
A_t - součet ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídajících nečistotám.

Příbuzné látky. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*) předepsanou ve zkoušce Vankomycin B.

Odděleně se nastřikují zkoušené roztoky (a), (b) a (c).

Obsah jednotlivých nečistot v procentech se vypočte ze vzorce:

$$\frac{(A_i\ /25)\ .\ 100}{A_b\ +\ (A_t\ /25)}\ ,$$

v němž značí:

A_i - plochu píku nečistoty na chromatogramu zkoušeného roztoku (a),

A_b - plochu píku odpovídajícího vankomycinu B na chromatogramu zkoušeného roztoku (b),

A_t - součet ploch píků odpovídajících nečistotám na chromatogramu zkoušeného roztoku (a).

Obsah žádné nečistoty není větší než 4,0 % a celkový obsah nečistot není větší než 7,0 %. Nepřihlíží se k píkům s plochou, která je menší než plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (c).

Těžké kovy (*2.4.8*). 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (30 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použijí 3 ml základního *roztoku olova (10 μg Pb/ml)*.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 5,0 %; stanoví se s 0,500 g zkoušené látky.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 1,0 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Pokud je látka určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného postupu odstraňujícího bakteriální endotoxiny, vyhovuje zkoušce na bakteriální endotoxiny, obsahuje-li nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v miligramu.

Stanovení účinnosti

Provede se mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik (*2.7.2*) za použití *vankomyciniumchloridu CRL* jako referenční látky.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem. Je-li látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka:

- sterilní,
- prostá bakteriálních endotoxinů.

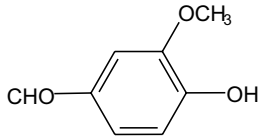
Separandum.

Nečistoty

A. N-demethylvankomycin,
B. desamidovankomycin,
C. aglukovankomycin,
D. desvankosaminylvankomycin.

Vanillinum

Vanilin



$C_8H_8O_3$ M_r 152,15 CAS 121-33-5

Je to 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_8O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek nebo jehličkovité krystalky. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v methanolu, dobře rozpustný v etheru. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz *Obecné zásady (1.2).*

A. Teplota tání *(2.2.14)*. 81 °C až 84 °C.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem *valininu CRL.*

C. Chromatogram získaný při zkoušce na Příbuzné látky se pozoruje po postřiku v denním světle. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. K 5 ml nasyceného roztoku zkoušené látky se přidá 0,2 ml *chloridu železitého RS1;* vznikne modré zbarvení. Zahřátím na 80 °C roztok zhnědne, jeho ochlazením vznikne bílá sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí v *lihu 96% R* a zředí se jím na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok H_6 *(2.2.2, Metoda II).*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R.*

Zkoušený roztok (a). 0,1 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *vanilinu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,5 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 100 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se v nenasycené komoře směsí objemových dílů *kyseliny octové bezvodé R*, *methanolu R* a *dichlormethanu R* (0,5 + 1 + 98,5) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší v proudu studeného vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při

254 nm. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b). Pak se vrstva postříká *zkoumadlem dinitrofenylhydrazinovým R* a pozoruje se v denním světle. Žádná skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (a), kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %).

Reakce s kyselinou sírovou. 50 mg se rozpustí v 5 ml *kyseliny sírové R*. Po 5 min není roztok zbarven intenzivněji než směs 4,9 ml základního žlutého roztoku a 0,1 ml základního červeného roztoku nebo směs 4,9 ml základního žlutého roztoku a 0,1 ml základního modrého roztoku *(2.2.2, Metoda I)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší 4 h v exsikátoru.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,05 %; stanoví se s 2,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,120 g se rozpustí ve 20 ml *lihu 96% R*, přidá se 60 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace *(2.2.20)* bodu ekvivalence.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 15,21 mg $C_8H_8O_3$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Vaselinum album

N

Bílá vazelína

Je to bělená, čištěná směs polotuhých nasycených uhlovodíků získaných z nafty.

Vlastnosti

Vazká lehce roztíratelná homogenní hmota, bílá nebo lehce nazelenalá, prakticky bez pachu. Je prakticky nerozpustná ve vodě, snadno rozpustná v etheru, dobře rozpustná v dichlormethanu, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v glycerolu.

Po roztavení vykazuje v denním světle nejvýše slabou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. 12 g se roztaví na vodní lázni. Roztavená hmota není zbarvena intenzivněji než směs objemových dílů základního žlutého roztoku a *kyseliny chlorovodíkové R* 15% (*V/V*) (1 + 9) *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 10 g zkoušené látky se smíchá s 20 ml vroucí *vody R* a protřepává se intenzivně 1 min, po ochlazení se zfiltruje. 10 ml filtrátu se smíchá s 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení na růžové se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Absorbance (*2.2.25*). 250 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v *trimethylpentanu R* a zředí se jím na 50,0 ml. Absorbance tohoto roztoku měřená při 300 nm je nejvýše 0,6.

10,0 ml výše uvedeného roztoku se zředí *trimethylpentanem R* na 25,0 ml. Absorbance měřená při 275 nm je nejvýše 0,8; absorbance měřená při 295 nm je nejvýše 0,4.

Tuky, pryskyřice, mýdla. 5 g se smíchá s 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 10 ml *vody R* a vaří se 2 min pod zpětným chladičem za častého protřepávání. Po ochlazení se oddělí čirá vodná vrstva a okyselí se *kyselinou chlorovodíkovou R;* roztok zůstane čirý *(2.2.1)*.

Vyšší aromatické uhlovodíky. *Použijí se rozpouštědla určená pro spektrální stanovení.*

Zkoušený roztok. 1,0 g se převede do dělicí nálevky (kohout ani zátka nejsou namazány) a protřepává se s 50 ml *hexanu R* do rozpuštění, je-li třeba mírným zahřátím. Pak se smíchá s 20 ml *dimethylsulfoxidu R* a protřepává se intenzivně 1 min. Nechá se stát do oddělení dvou čirých vrstev. Spodní vrstva se převede do jiné dělicí nálevky. Horní vrstva se protřepává znovu s 20 ml *dimethylsulfoxidu R.* Ke spojeným dimethylsulfoxidovým vrstvám se přidá 20 ml *hexanu R* a protřepává se 1 min. Nechá se stát do oddělení dvou čirých vrstev. Horní vrstva se odstraní a spodní vrstva se *dimethylsulfoxidem R* zředí na 50 ml.
Kontrolní roztok. 10 ml *dimethylsulfoxidu R* se protřepává 1 min s 25 ml *hexanu R;* použije se čirá horní vrstva.
Porovnávací roztok. 60 μg *naftalenu R* se rozpustí v *dimethylsulfoxidu R* a zředí se jím na 10 ml.

Absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku měřená při 265 nm až 420 nm při tloušťce vrstvy 40 mm proti kontrolnímu roztoku není vyšší než absorbance porovnávacího roztoku měřená při 278 nm při tloušťce vrstvy 40 mm proti *dimethylsulfoxidu R.*

Cizí, snadno zuhelnitelné látky. 5 ml roztavené látky se ve zkumavce se zabroušenou zátkou smíchá s 5 ml *kyseliny sírové R* 90% a zahřívá se ve vodní lázni tak, aby se dno zkumavky nedotýkalo dna vodní lázně. Vždy po 2 min se zkumavka vyjme, uzavře se zátkou a otočí dnem vzhůru a zpět desetkrát v průběhu 10 s (zkumavka může být mimo vodní lázeň nejvýše 20 s). Po 10 min se zkumavka z vodní lázně vyjme; vrstva kyseliny sírové zůstane čirá a není zbarvena intenzivněji než směs 0,5 ml základního modrého roztoku, 1,5 ml základního červeného roztoku a 3 ml základního žlutého roztoku (*2.2.2, Metoda II*).

Sloučeniny obsahující síru. 3 g se smíchají s 0,1 ml *octanu olovnatého RS* a 2 ml *ethanolu R* a směs se zahřívá 10 min ve vodní lázni při 70 °C za častého protřepávání; směs neztmavne.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

Vaselinum flavum

N

Žlutá vazelína

Je to čištěná směs polotuhých nasycených uhlovodíků získaných z nafty.

Vlastnosti

Vazká lehce roztíratelná homogenní hmota, světle žlutá až žlutá, průsvitná, prakticky bez pachu. Je prakticky nerozpustná ve vodě, snadno rozpustná v etheru, dobře rozpustná v dichlormethanu, prakticky nerozpustná v lihu 96% a v glycerolu.

Po roztavení vykazuje v denním světle nejvýše slabou fluorescenci.

Zkoušky na čistotu

Vzhled. 12 g se roztaví na vodní lázni. Roztavená hmota není zbarvena intenzivněji než směs objemových dílů základního žlutého roztoku a základního červeného roztoku (7,6 + 2,4) *(2.2.2, Metoda II).*

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 10 g zkoušené látky se smíchá s 20 ml vroucí *vody R* a protřepává se intenzivně 1 min, po ochlazení se zfiltruje. 10 ml filtrátu se smíchá s 0,1 ml *fenolftaleinu RS;* roztok je bezbarvý. Ke změně zbarvení na růžové se spotřebuje nejvýše 0,5 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Absorbance (*2.2.25*). 50 mg se rozpustí, je-li třeba mírným zahřátím, v *trimethylpentanu R* a zředí se jím na 100,0 ml. Absorbance tohoto roztoku měřená při 290 nm je nejvýše 0,6.

10,0 ml výše uvedeného roztoku se zředí *trimethylpentanem R* na 25,0 ml. Absorbance měřená při 275 nm je nejvýše 0,8; absorbance měřená při 295 nm je nejvýše 0,4.

Tuky, pryskyřice, mýdla. 5 g se smíchá s 10 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 5 ml *vody R* a vaří se 2 min pod zpětným chladičem za častého protřepávání. Po ochlazení se oddělí čirá vodná vrstva a okyselí se *kyselinou chlorovodíkovou R;* roztok zůstane čirý *(2.2.1).*

Vyšší aromatické uhlovodíky. *Použijí se rozpouštědla určená pro spektrální stanovení.*

Zkoušený roztok. 1,0 g se převede do dělicí nálevky (kohout ani zátka nejsou namazány) a protřepává se s 50 ml *hexanu R* do rozpuštění, je-li třeba mírným zahřátím. Pak se smíchá s 20 ml *dimethylsulfoxidu R* a protřepává se intenzivně 1 min. Nechá se stát do oddělení dvou čirých vrstev. Spodní vrstva se převede do jiné dělicí nálevky. Horní vrstva se protřepává znovu s 20 ml *dimethylsulfoxidu R.* Ke spojeným dimethylsulfoxidovým vrstvám se přidá 20 ml *hexanu R* a protřepává se 1 min. Nechá se stát do oddělení dvou čirých vrstev. Horní vrstva se odstraní a spodní vrstva se *dimethylsulfoxidem R* zředí na 50 ml.

Kontrolní roztok. 10 ml *dimethylsulfoxidu R* se protřepává 1 min s 25 ml *hexanu R;* použije se čirá horní vrstva.

Porovnávací roztok. 90 μg *naftalenu R* se rozpustí v *dimethylsulfoxidu R* a zředí se jím na 10 ml.

Absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku měřená při 265 nm až 420 nm při tloušťce vrstvy 40 mm proti kontrolnímu roztoku není vyšší než absorbance porovnávacího roztoku měřená při 278 nm při tloušťce vrstvy 40 mm proti *dimethylsulfoxidu R.*

Cizí, snadno zuhelnitelné látky. 5 ml roztavené látky se ve zkumavce se zabroušenou zátkou smíchá s 5 ml *kyseliny sírové R* 80% a zahřívá se ve vodní lázni tak, aby se dno zkumavky nedotýkalo dna vodní lázně. Vždy po 2 min se zkumavka vyjme, uzavře se zátkou a otočí dnem vzhůru a zpět desetkrát v průběhu 10 s (zkumavka může být mimo vodní lázeň nejvýše 20 s). Po 10 min se zkumavka z vodní lázně vyjme; vrstva kyseliny sírové zůstane čirá a není zbarvena intenzivněji než směs 0,5 ml základního modrého roztoku, 1,5 ml základního červeného roztoku a 3 ml základního žlutého roztoku (*2.2.2, Metoda II*).

Sloučeniny obsahující síru. 3 g se smíchají s 0,1 ml *octanu olovnatého RS* a 2 ml *ethanolu R* a směs se zahřívá ve vodní lázni při 70 °C za častého protřepávání; směs neztmavne.

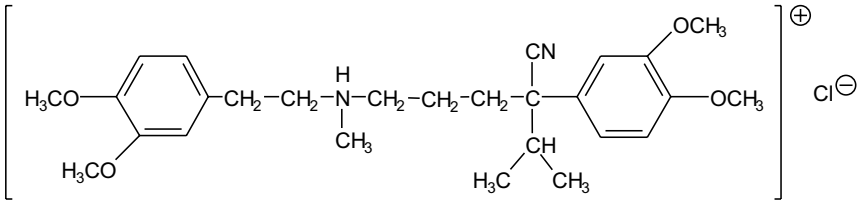
Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněna před světlem.

† Verapamili hydrochloridum

Verapamiliumchlorid



$C_{27}H_{39}ClN_2O_4$ M_r 491,07 CAS 152-11-4

Je to (*RS*)-N-[2-(3,4-dimethoxyfenyl)ethyl]-N-{[4-(3,4-dimethoxyfenyl)-4-isopropyl-4-kyanido]-butyl}methylamoniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny $C_{27}H_{39}ClN_2O_4$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Taje při asi 144 °C.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B a D.
Alternativní sestava zkoušek: A, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. 20,0 mg se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 50,0 ml. Měří se absorbance roztoku (*2.2.25*) při 210 nm až 340 nm; roztok vykazuje dvě absorpční maxima, při 229 nm a 278 nm, a může vykazovat prodlevu při 282 nm. Poměr absorbance naměřené v maximu při 278 nm k absorbanci naměřené v maximu při 229 nm je 0,35 až 0,39.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *verapamiliumchloridu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané z první vrstvy ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

D. Vyhovuje zkoušce (b) na chloridy *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí za mírného zahřívání ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 20 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 6,0; měří se roztok S.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití dvou vrstev vhodného silikagelu.

Zkoušený roztok (a). 0,25 g se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 25 mg *verapamiliumchloridu CRL* se rozpustí v *chloroformu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (b). 1 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *chloroformem R* na 20 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 ml porovnávacího roztoku (b) se zředí *chloroformem R* na 25 ml.

Na první vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *acetonu R*, *kyseliny octové ledové R*, *methanolu R* a *toluenu R* (5 + 5 + 20 + 70) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min na vzduchu, pak se vyvíjení opakuje a suší se 30 min při 110 °C. Nechá se stát do vymizení pachu mobilní fáze.

Na druhou vrstvu se nanese odděleně 10 µl zkoušeného roztoku (a), 10 µl porovnávacího roztoku (b) a 10 µl porovnávacího roztoku (c) a vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (15 + 85) po dráze 15 cm. Vrstva se suší 10 min na vzduchu, pak se vyvíjení opakuje a suší se 90 min při 110 °C. Nechá se stát do vymizení pachu mobilní fáze.

Vrstvy se postříkají roztokem obsahujícím *chlorid železitý R* (50 g/l) a *jod R* (20 g/l) ve směsi stejných objemových dílů *acetonu R* a roztoku *kyseliny vinné R* (200 g/l); na vrstvu o ploše 200 mm^2 se použije 15 ml až 20 ml. Obě vrstvy se ihned pozorují. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,05 %) a nejvýše tři takové skvrny jsou intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,02 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je zřetelně viditelná skvrna. Nepřihlíží se ke skvrnám, které zůstaly na startu.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (10 µg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 1,0 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,400 g se rozpustí ve 40 ml *kyseliny octové bezvodé R* a přidá se 6 ml *octanu rtuťnatého RS*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 49,11 mg $C_{27}H_{39}ClN_2O_4$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Veratri albi radix

N

Kořen kýchavice

Synonymum. Radix veratri albi

Je to usušený oddenek a kořeny druhu *Veratrum album* L.
Obsahuje nejméně 1,0 % alkaloidů, vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga bez pachu; práškovaná droga silně dráždí ke kýchání.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A a B.

Zkoušky totožnosti

A. Oddenek někdy podélně rozpůlený, jednohlavý nebo vícehlavý, opakvejčitý nebo téměř válcovitý, až 5 cm dlouhý, o průměru 2 cm až 3 cm, nahoře někdy se zbytky listů. Na povrchu šedohnědý nebo černohnědý, hrubě prstencovitě zaškrcovaný, s četnými kořeny nebo s kořenovými jizvami. Oddenek na lomu bělošedý; kůra úzká, centrální cylindr široký. Kořeny o průměru až 3 mm, na povrchu šedožluté až nažloutle hnědé, svraskalé, na lomu bělošedé; kůra široká, centrální svazek cévní velmi malý.

B. Droga se upráškuje (355). Prášek je šedohnědý. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky parenchymu s velkými mírně ztlustlými buňkami; kulovitá až vejčitá škrobová zrna o průměru 2 μm až 25 μm, někdy i dvojčetná až čtyřčetná zrna; malé rafidy šťavelanu vápenatého; úlomky černohnědého metadermu; úlomky pokožky kořenů a jednořadé endodermis s buňkami podkovovitě ztlustlými; tečkovaně a schodovitě ztlustlé cévy; mírně ztlustlá nezdřevnatělá vlákna.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*

Zkoušený roztok. 50 ml filtrátu ze zkoušky Stanovení obsahu se odpaří na vodní lázni do sucha a zbytek se rozpustí v 1 ml *chloroformu R*.
Porovnávací roztok. 10 mg *chininiumchloridu R* a 50 mg *atropiniumsulfatu R* se rozpustí v 10 ml *lihu 96% R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů 20 μl zkoušeného roztoku a 40 μl porovnávacího roztoku. Vyvíjí se směsí objemových dílů *diethylaminu R* a *cyklohexanu R* (30 + 70) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a vyvíjí se ještě dvakrát za výše uvedených podmínek. Pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrná intenzivní skvrna pod čelem chromatogramu (zygadenin) a další odpovídající přibližně polohou skvrně atropiniumsulfatu na chromatogramu porovnávacího roztoku (veratroyl-zygadenin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další, méně intenzivní skvrny. Vrstva se postříká *jodobismutitanem draselným RS*. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku (veratroyl-zygadenin a protoveratrin B) odpovídají přibližně polohou skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Mezi skvrnou odpovídající veratroyl-zygadeninu a čelem chromatogramu jsou patrné dvě intenzivní skvrny (protoveratrin A a germitetrin). Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další skvrny.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 3 % nadzemních částí matečné rostliny a nejvýše 1 % zčernalé drogy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 15,0 %. 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 12,0 %.

Stanovení obsahu

7,000 g práškované drogy (355) se smíchá se 70,0 g *etheru R* a 3,0 ml *amoniaku zředěného RS1* a protřepává se intenzivně 30 min. Pak se přidají 3 ml *vody R* a znovu se intenzivně protřepe. Po usazení částic drogy se rychle zfiltruje přes chomáček vaty, nálevka se během filtrace přikryje hodinovým sklem. Filtrát se použije i ve Zkoušce totožnosti C.

40,00 g filtrátu (odpovídá 4,00 g drogy) se v dělicí nálevce protřepává 15 ml a pak třikrát 10 ml směsi složené z objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové 10% RS* a *vody R* (1 + 9). Spojené spodní vrstvy se v další dělicí nálevce zalkalizují *amoniakem zředěným RS1* a protřepávají se pětkrát 15 ml *etheru R*. Spojené horní vrstvy se v předem zvážené baňce odpaří na vodní lázni do sucha, zbytek se suší 1 h v sušárně při 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Verbasci flos

N

Diviznový květ

Synonymum. Flos verbasci

Je to usušená květní koruna druhu *Verbascum phlomoides* L. nebo druhu *Verbascum densiflorum* BERTOL. nebo jejich směs.

Vlastnosti

Droga charakteristického pachu po medu, nasládlé, slizovité chuti.
Makroskopický a mikroskopický popis, viz Zkoušky totožnosti A, B a C.

Zkoušky totožnosti

A. Koruna souměrná, kolovitá, žlutá, trubka krátká, lem s pěti nestejnými cípy (dva horní nejmenší, spodní, prostřední největší). Koruna na spodní straně chlupatá, na svrchní straně lysá. Tyčinky ke koruně přirostlé, horní tři jsou bílé nebo nažloutle chlupaté, s ledvinitými, příčně nasazenými prašníky, dolní dvě tyčinky jsou delší, lysé, se sbíhavými prašníky.

B. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Buňky pokožky se stěnami mírně vlnitě zprohýbanými, obsahují sférokrystaly hesperidinu. Na spodní straně četné mnohobuněčné přeslenitě větvené krycí chlupy, jen zřídka žláznaté chlupy se čtyřbuněčnou až osmibuněčnou

hlavičkou. Bezbarvý mezofyl několikavrstevný z okrouhlých až hvězdicovitých buněk s četnými intercelulárami a slizovými buňkami. Cévy jemné, šroubovitě ztlustlé, rozvětvené, anastomozují cí. Nitky horních tyčinek s dlouhými jednobuněčnými kyjovitě rozšířenými chlupy, na povrchu bradavčitými. Chlupy mohou obsahovat sférokrystaly hesperidinu. Pylová zrna oranžovočervená kulovitá o průměru 30 μm až 45 μm, se třemi klíčními póry a jemně zrnitou exinou.

C. Droga se upráškuje (355). Prášek je žlutý. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky mnohobuněčných krycích chlupů přeslenitě větvených; úlomky pokožky se sférokrystaly hesperidinu a jemných šroubovitě ztlustlých cév; jednobuněčné kyjovitě rozšířené krycí chlupy, někdy se sférokrystaly hesperidinu; pylová zrna oranžovočervená kulovitá o průměru 30 μm až 45 μm, se třemi klíčními póry a jemně zrnitou exinou.

D. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1 g práškované drogy (355) se smíchá s 10 ml *methanolu R* a zahřívá se 5 min ve vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení se zfiltruje.

Porovnávací roztok. 5 mg *rutinu R* a 5 mg *hyperosidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny mravenčí bezvodé R, kyseliny octové ledové R*, *vody R* a *ethylacetatu R* (11 + 11 + 27 + 100) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší v proudu horkého vzduchu a ještě horká se postříká roztokem *difenylboryloxyethylaminu R* (10 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je skvrna odpovídající polohou a zbarvením skvrně rutinu na chromatogramu porovnávacího roztoku a modře fluoreskující skvrna odpovídající přibližně polohou skvrně hyperosidu na chromatogramu porovnávacího roztoku. Bezprostředně nad a pod touto modře fluoreskující skvrnou jsou dvě skvrny fluoreskující oranžově žlutě, v blízkosti čela chromatogramu je intenzivně žlutá skvrna a pod ní skvrna fluoreskující modře.

Zkoušky na čistotu

Cizí příměsi (*2.8.2*). Nejvýše 2 % a nejvýše 10 % zhnědlé drogy.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 10,0 %; 2,000 g práškované drogy (355) se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 6,0 %.

Číslo bobtnavosti (*2.8.4*). Nejméně 12,0; stanoví se s 0,200 g práškované drogy (355).

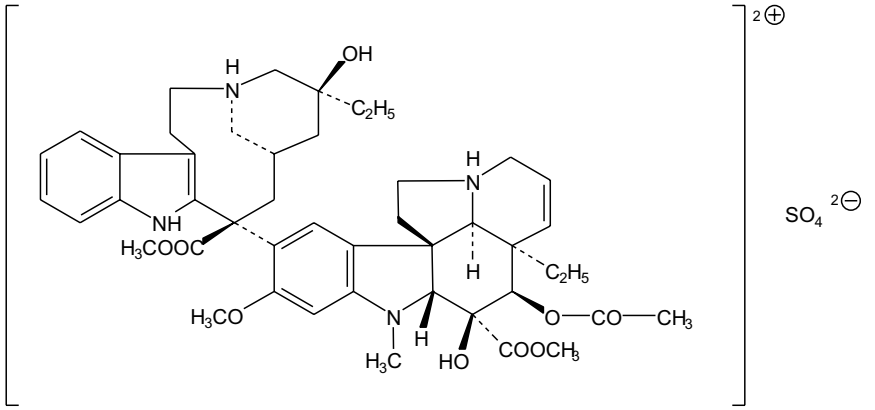
Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem a vlhkostí.

† Vinblastini sulfas

Vinblastiniumsulfat

Synonymum. Vinblastinium sulfuricum



$C_{46}H_{60}N_4O_{13}S$ M_r 909,06 CAS 143-67-9

Je to vinkaleukoblastiniumsulfat (1 : 1). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 104,0 % sloučeniny $C_{46}H_{60}N_4O_{13}S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je velmi hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96% a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. vinblastiniumsulfatu.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a přibližnou velikostí hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Hodnota pH. 3,5 až 5,0; měří se roztok připravený zředěním 3 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,0 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než 2,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5,0 %).

Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

Ztráta sušením. Nejvýše 15,0 %; stanoví se termogravimetricky *(2.2.34)* se 3 mg zkoušené látky. Zahřívá se rychlostí 5 °C/min až na teplotu 200 °C v proudu *dusíku pro chromatografii R* přiváděného průtokovou rychlostí 40 ml/min.

Sterilita *(2.6.1).* Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29). Roztoky se před použitím uchovávají v ledové vodě.*

Zkoušený roztok. 1,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *vinblastiniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 mg *vinkristiniumsulfatu CRL* se rozpustí v 1,0 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *vodou R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm). Mezi pumpu a injektor se umístí předkolona naplněná vhodným silikagelem,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *diethylaminu R* (1,5 % *V/V*) upraveného na hodnotu pH 7,5 přidáním *kyseliny fosforečné R*, *acetonitrilu R* a *methanolu R* (38 + 12 + 50), s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 262 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se po 10 μl každého roztoku a zaznamenají se chromatogramy po dobu odpovídající 3násobku retenčního času píku vinblastinu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je rozlišení mezi píkem vinkristinu a píkem vinblastinu nejméně 4 a pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) má poměr signálu k šumu nejméně 5. Vypočítá se obsah $C_{46}H_{60}N_4O_{13}S$ v procentech z plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku a plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a deklarovaného obsahu *vinblastiniumsulfatu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující -20 °C. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených skleněných obalech.

Separandum.

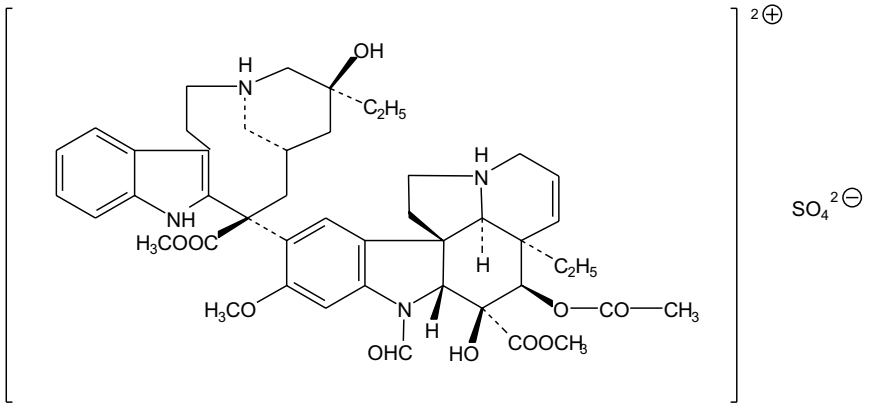
Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka sterilní.

† Vincristini sulfas

Vinkristiniumsulfat

Synonymum. Vincristinium sulfuricum.



$C_{46}H_{58}N_4O_{14}S$ M_r 923,04 CAS 2068-78-2

Je to 22-oxovinkaleukoblastiniumsulfat (1 : 1). Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 95,0 % až 104,0 % sloučeniny $C_{46}H_{58}N_4O_{14}S$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Je velmi hygroskopický, snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje s *referenčním spektrem Ph. Eur. vinkristiniumsulfatu.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Hlavní pík na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a přibližnou velikostí hlavnímu píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 50,0 mg se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 10,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Hodnota pH. 3,5 až 4,5; měří se roztok připravený zředěním 2 ml roztoku S *vodou prostou oxidu uhličitého R* na 10 ml.

Příbuzné látky. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (2,0 %) a součet ploch všech těchto píků není větší než 2,5násobek plochy hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (5,0 %).

Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d).

Ztráta sušením. Nejvýše 12,0 %; stanoví se termogravimetricky *(2.2.34)* se 3 mg zkoušené látky. Zahřívá se rychlostí 5 °C/min až na teplotu 200 °C v proudu *dusíku pro chromatografii R* přiváděného průtokovou rychlostí 40 ml/min.

Sterilita *(2.6.1).* Pokud je látka určena pro výrobu parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29). Roztoky se před použitím uchovávají v ledové vodě.*

Zkoušený roztok. 1,0 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, se zředí *vodou R* na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 5,0 mg *vinkristiniumsulfatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 mg *vinblastiniumsulfatu CRL* se rozpustí v 1,0 ml porovnávacího roztoku (a).
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *vodou R* na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 1,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí *vodou R* na 20,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm). Mezi čerpadlo a nástřikový prostor se umístí předkolona naplněná vhodným silikagelem,
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *diethylaminu R* (1,5 % *V/V*) upraveného na hodnotu pH 7,5 přídavkem *kyseliny fosforečné R* a *methanolu R* (30 + 70). Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 297 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se po 10 μl každého roztoku a zaznamenají se chromatogramy po dobu odpovídající 3násobku retenčního času píku vinkristinu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) je rozlišení mezi píkem vinkristinu a píkem vinblastinu nejméně 4 a pík na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) má poměr signálu k šumu nejméně 5. Vypočítá se obsah $C_{46}H_{58}N_4O_{14}S$ v procentech za použití plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku, hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) a deklarovaného obsahu *vinkristiniumsulfatu CRL*.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující -20 °C. Jestliže je látka sterilní, uchovává se ve sterilních, vzduchotěsných, zabezpečených, skleněných obalech.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je látka sterilní.

† Vitamini A pulvis

Vitamin A prášek

Je to ester retinolu (acetat, propionat nebo palmitat) nebo směs těchto esterů připravených synteticky dispergovaný želatinou, arabskou klovatinou nebo jinou vhodnou látkou. Obsahuje nejméně 250 000 m.j. vitaminu A na gram.

Přípravek obsahuje 95,0 % až 115,0 % obsahu uvedeného v označení a může obsahovat vhodné stabilizátory jako antioxidanty.

Vlastnosti

Nažloutlý prášek obvykle ve formě částic téměř stejné velikosti, které v závislosti na složení jsou prakticky nerozpustné ve vodě nebo bobtnají anebo tvoří emulzi.

Zkoušky totožnosti

Množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 50 000 m.j. se vpraví do zkumavky a umístí se do vodní lázně 60 °C teplé, přidá se 1,5 ml *amoniaku zředěného RS2* zahřátého na 60 °C a občas se protřepe. Po 10 min se směs převede do odměrné baňky na 200 ml pomocí 40 ml *ethanolu R* a doplní se *etherem R* po značku. Protřepe se, nechá se stát několik minut a pro zkoušky totožnosti se použije supernatant, roztok (a).

Určité přípravky nereagují dostatečně během zmíněného postupu. Pro tyto přípravky by se měl objem roztoku (a) pro následující zkoušky podstatně zvýšit. Zvýšení objemu může být až desetinásobné.

A. 5 ml roztoku (a) se zředí na 100 ml *2-propanolem R1*. Roztok vykazuje absorpční maximum *(2.2.25)* při 325 nm až 327 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 ml roztoku (a) se odpaří do sucha v proudu dusíku. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *cyklohexanu R*.

Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky v *cyklohexanu R* obsahující asi 5 m.j. v mikrolitru:

a) *retinolacetatu CRL*,

b) *retinolpropionatu CRL*,

c) *retinolpalmitatu CRL*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned bez odpaření rozpouštědla směsí objemových dílů *etheru R* a *cyklohexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *chloridem antimonitým RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je patrna modrá skvrna nebo skvrny shodné se skvrnou nebo skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků a složení zkoušeného roztoku je vyjádřeno skvrnou nebo skvrnami odpovídajícími porovnávacím roztokům (a), (b) a (c).

C. 2 ml roztoku (a) se zředí *pentanem R* na 50 ml. 1 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha v proudu dusíku. Zbytek se rozpustí v 1 ml *chloroformu R* a přidá se 5 ml *chloridu antimonitého RS;* okamžitě vznikne přechodné jasně modré zbarvení.

Zkouška na čistotu

Příbuzné látky a rozkladné produkty. Použijí se hodnoty absorbance získané při stanovení obsahu. Poměr A_{300}/A_{325} je nejvýše 0,612 a součet hodnot A_{300}/A_{325} a A_{350}/A_{325} je nejvýše 1,054, kde A_{300}, A_{325} a A_{350} jsou absorbance *(2.2.25)* změřené jednotlivě při 300 nm, 325 nm a 350 nm.

Stanovení obsahu

Stanovení obsahu se provede, jak nejrychleji je možné, za ochrany před světlem a přístupu oxidačních látek a nad roztoky je třeba udržovat, pokud je to možné, atmosféru dusíku.

Spektrofotometrická měření se provádějí při 20 °C až 25 °C.

Před každou sérií měření se zkontroluje správnost stupnice vlnových délek spektrofotometru *(2.2.25)* a stupnice absorbancí. Absorbance lepených křemenných kyvet naplněných *2-propanolem R1* se nesmí vzájemně lišit o více než 0,002 při každé z vlnových délek 300 nm, 325 nm, 350 nm a 370 nm.

Každé stanovení se provede dvakrát, s použitím vždy zvláštní navážky zkoušeného přípravku.

Přípravek se před stanovením obsahu důkladně promíchá. Množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 50 000 m.j. se odváží s přesností na 0,1 % a vpraví se do baňky. Přidá se 5 ml *vody R*, 20 ml *ethanolu R*, 1 ml *askorbanu sodného RS* a 3 ml čerstvě připraveného 50% roztoku *hydroxidu draselného R*. Vaří se pod zpětným chladičem na vodní lázni 30 min. Rychle se ochladí, převede se do dělicí nálevky pomocí dvakrát 15 ml *vody R*, jedenkrát 10 ml *lihu 96% R* a dvakrát 50 ml *pentanu R* a 30 s se intenzivně protřepává. Pak se nechá stát, až se vytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vodně-lihová vrstva se převede do druhé dělicí nálevky a protřepe se směsí 10 ml *lihu 96% R* a 50 ml *pentanu R*. Po oddělení se převede spodní vrstva do třetí dělicí nálevky a pentanová vrstva do první dělicí nálevky. Druhá dělicí nálevka se promyje dvakrát 10 ml *pentanu R* a výtřepky se přidají do první dělicí nálevky. Vodně-lihová vrstva ve třetí dělicí nálevce se protřepe s 50 ml *pentanu R* a pentanová vrstva se přidá do první dělicí nálevky. Spojené pentanové výtřepky se v první dělicí nálevce promyjí intenzivním protřepáním dvakrát 50 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v lihu 10% *(V/V)* a pak se promývají postupně vždy 50 ml vody, až jsou poslední výtřepky neutrální na fenolftalein. Promytý pentanový výtřepek se převede do 250ml odměrné baňky, dělicí nálevka se promyje 10 ml *pentanu R*, který se přidá do odměrné baňky, a její obsah se zředí *pentanem R* na 250,0 ml. Část tohoto roztoku se zředí *2-propanolem R1* tak, aby koncentrace výsledného roztoku byla 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru. Za použití *2-propanolu R1* jako kontrolní tekutiny se ověří, že absorpční maximum roztoku je v rozmezí 324 nm až 326 nm, a změří se absorbance při 300 nm, 325 nm, 350 nm a 370 nm. Odečtení se opakují při každé vlnové délce několikrát a vypočtou se průměrné hodnoty. Pro každou vlnovou délku λ se vypočte poměr A_λ/A_{325}.

Jestliže tyto poměry jsou vyšší než následující hodnoty: 0,612 při 300 nm, 0,452 při 350 nm, 0,093 při 370 nm, spojené výtřepky se odstraní a celý předcházející postup se opakuje.

Obsah vitaminu *A* v mezinárodních jednotkách v gramu se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_{325} \,.\, V \,.\, 1830}{100\ m},$$

v němž značí:

A_{325} - absorbanci při 325 nm,

m - hmotnost zkoušeného přípravku v gramech,

V - celkový objem, na který je extrakt ředěn, aby obsahoval 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru,

1830 - faktor k převedení specifické absorbance retinolu na mezinárodní jednotky v gramu.

Uchovávání

V dobře uzavřených vzduchotěsných nádobách, chráněn před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C. Po otevření nádoby by se měl okamžitě její obsah použít; každá nespotřebovaná část obsahu by se měla chránit atmosférou inertního plynu.

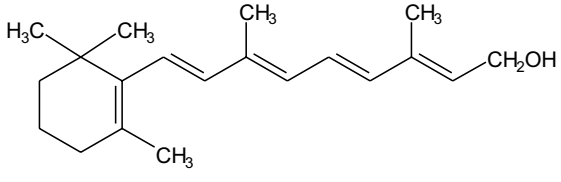
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v gramu,
- název esteru nebo esterů,
- název použité základní pomocné látky nebo látek a název každého přidaného stabilizátoru.

† Vitaminum A

Vitamin A



Pod názvem vitamin A je zahrnováno množství látek velmi podobné struktury nacházejících se v živočišných tkáních a vykazujících podobnou účinnost. Hlavní a biologicky nejaktivnější látkou je all-*trans*-retinol, který může být připraven synteticky v čistém stavu nebo může být získán z přírodních zdrojů (ryb, olejů, jater mořských savců a přírodních koncentrátů), přičemž je doprovázen několika izomery.

All-*trans*-retinol je primární alkohol $C_{20}H_{30}O$ (M_r 286,46; CAS 68–26–8) s pěti konjugovanými vazbami, které mají acyklickou *trans*-konfiguraci: [all-(*E*)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexenyl)-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol].

Látka tvoří světle žluté jehlice, prakticky nerozpustné ve vodě, snadno rozpustné v lihu 96%, etheru, etheru petrolejovém a mastných olejích. Látka vykazuje v ultrafialovém světle při 365 nm intenzivní zelenavou fluorescenci.

Roztok látky v *2-propanolu R1* vykazuje v ultrafialovém světle absorpční spektrum s maximem při 325 nm. Vitamin A se všeobecně používá ve formě esterů, jako acetat, propionat nebo palmitat, které se dodávají jako olejové koncentrované roztoky, vodné disperze nebo ve formě prášku.

Účinnost vitaminu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách. 1 m.j. vitaminu A odpovídá účinnosti 0,344 μg all-*trans*-retinolacetatu. Účinnost ostatních sloučenin vitaminu A se vypočítá stechiometricky tak, že 1 m.j. vitaminu A odpovídá účinnosti: 0,300 μg all-*trans*-retinolu, 0,359 μg all-*trans*-retinolpropionatu, 0,550 μg all-*trans*-retinolpalmitatu. Vitamin A a jeho estery jsou velmi citlivé na působení vzduchu, oxidačních látek, kyselin a světla.

† Vitaminum A densatum oleosum

Olejový roztok vitaminu A

Je to ester retinolu (acetat, propionat nebo palmitat) nebo směs těchto esterů připravených synteticky. K jeho případnému zředění může být použit vhodný rostlinný olej.

Obsahuje nejméně 500 000 m.j. vitaminu A v gramu. Olejový roztok obsahuje 95,0 % až 110,0 % obsahu uvedeného v označení a může obsahovat vhodné stabilizátory jako antioxidanty.

Vlastnosti

Žlutá nebo hnědožlutá olejovitá kapalina. Je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný nebo částečně rozpustný v ethanolu, mísitelný s organickými rozpouštědly. Ve velmi koncentrovaných roztocích se může objevit částečná krystalizace.

Zkoušky totožnosti

A. Připraví se roztok v *2-propanolu R1* obsahující 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru. Absorpční maximum *(2.2.25)* roztoku je při 325 nm až 327 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. Připraví se roztok v *cyklohexanu R* obsahující asi 5 m.j. v mikrolitru.

Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky v *cyklohexanu R* obsahující asi 5 m.j. v mikrolitru:

a) *retinolacetatu CRL*,

b) *retinolpropionatu CRL*,

c) *retinolpalmitatu CRL*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned bez odpaření rozpouštědla směsí objemových dílů *etheru R* a *cyklohexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *chloridem antimonitým RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna anebo skvrny shodné se skvrnou nebo skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků a složení zkoušeného roztoku je vyjádřeno skvrnou nebo skvrnami odpovídajícími porovnávacím roztokům (a), (b) a (c).

C. Připraví se roztok v *chloroformu R* obsahující 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru. K 1 ml tohoto roztoku se přidá 5 ml *chloridu antimonitého RS;* ihned vznikne přechodné jasně modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Číslo kyselosti *(2.5.1)*. Nejvýše 2,0; stanoví se s 2,00 g zkoušeného přípravku.

Peroxidy. 0,300 g se přidá k 25,0 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (4 + 6) (roztok a). K 1,0 ml roztoku *chloridu železitého R* (270 g/l) se přidá 99,0 ml směsi objemových dílů *methanolu R* a *toluenu R* (4 + 6). 2,0 ml tohoto roztoku se zředí na 100,0 ml stejnou směsí rozpouštědel (roztok b). Do dvou zkumavek se přidá postupně po 0,3 ml roztoku *thiokyanatanu amonného R* (18 g/l), 10,0 ml *methanolu R*, 0,3 ml *síranu železnatého RS2* a 15,0 ml *toluenu R* a po každém přidání se promíchá. Do jedné zkumavky se přidá 1,0 ml roztoku (a) a do druhé 1,0 ml roztoku (b), promíchá se a nechá se stát 5 min; zbarvení roztoku (a) není intenzivnější než zbarvení roztoku (b).

Stanovení obsahu

Stanovení obsahu se neprovádí u koncentrátů vitaminu A získaných z přírodních zdrojů.

Stanovení obsahu se provede, jak nejrychleji je možné, za ochrany před světlem a přístupu oxidačních látek a nad roztoky je třeba udržovat, pokud je to možné, atmosféru dusíku.

Spektrofotometrická měření se provádějí při 20 °C až 25 °C. Před každou sérií měření se zkontroluje správnost stupnice vlnových délek spektrofotometru *(2.2.25)* a stupnice absorbancí. Absorbance lepených křemenných kyvet naplněných *2-propanolem R1* se nesmí vzájemně lišit o více než 0,002 při každé z vlnových délek 300 nm, 325 nm, 350 nm a 370 nm.

Každé stanovení se provede dvakrát, s použitím vždy zvláštní navážky zkoušeného přípravku.

Provede se stanovení obsahu podle metody A. Ukáže-li se toto stanovení jako nevhodné, použije se metoda B.

Metoda A. 25 mg až 100 mg odvážené s přesností 0,1 % se rozpustí v 5 ml *pentanu R* a zředí se *2-propanolem R1* na předpokládanou koncentraci 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru.

Za použití *2-propanolu R1* jako kontrolní tekutiny se ověří, že maximum absorpce připraveného roztoku je mezi 325 nm a 327 nm, a změří se absorbance při 300 nm, 326 nm, 350 nm a 370 nm. Při každé vlnové délce se provede odečtení několikrát a použijí se průměrné hodnoty. Pro každou vlnovou délku λ se vypočítá poměr A_λ/A_{326}.

Nepřevyšuje-li tento poměr hodnotu: 0,593 při 300 nm, 0,537 při 350 nm, 0,142 při 370 nm, vypočítá se obsah vitaminu A v mezinárodních jednotkách v gramu podle vztahu

$$\frac{A_{326} \,.\, V \,.\, 1900}{100m},$$

v němž značí:

A_{326} - absorbanci při 326 nm,

m - hmotnost zkoušeného přípravku v gramech,

V - celkový objem, na který byl zkoušený přípravek naředěn, aby obsahoval 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru,

1900 - faktor k převedení specifické absorbance esterů retinolu na mezinárodní jednotky v gramu.

Jestliže jeden nebo více poměrů A_λ/A_{326} převyšuje dané hodnoty nebo jestliže vlnová délka maxima absorpce není mezi 325 nm a 327 nm, použije se Metoda B.

Metoda B. Množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 50 000 m.j. navážené s přesností 0,1 % se vpraví do baňky. Přidá se 20 ml *ethanolu R*, 1 ml *askorbanu sodného RS* a 3 ml čerstvě připraveného 50% roztoku *hydroxidu draselného R* a vaří se pod zpětným chladičem na vodní lázni 30 min. Rychle se ochladí a kapalina se převede do dělicí nálevky pomocí dvakrát 15 ml *vody R*, jednou 10 ml *lihu 96% R* a dvakrát 50 ml *pentanu R* a 30 s se intenzivně protřepává. Pak se nechá stát, až se vytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vodně-lihová vrstva se převede do druhé dělicí nálevky a protřepe se směsí 10 ml *lihu 96% R* a 50 ml *pentanu R*. Po oddělení se převede vodně-lihová vrstva do třetí dělicí nálevky a pentanová vrstva do první dělicí nálevky. Druhá dělicí nálevka se promyje dvakrát 10 ml *pentanu R* a výtřepky se přidají do první dělicí nálevky. Vodně-lihová vrstva ve třetí dělicí nálevce se protřepe s 50 ml *pentanu R* a pentanová vrstva se přidá do první dělicí nálevky. Spojené pentanové výtřepky se v první dělicí nálevce promyjí intenzivním protřepáním dvakrát 50 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu R* 10% *(V/V)* a pak se promývají postupně vždy 50 ml *vody R*, až jsou poslední výtřepky neutrální na fenolftalein. Promytý pentanový výtřepek se převede do 250ml odměrné baňky, dělicí nálevka se promyje 10 ml *pentanu R*, který se přidá do odměrné baňky, a její obsah se zředí *pentanem R* na 250,0 ml. Část tohoto roztoku se zředí *2-propanolem R1* tak, aby koncentrace výsledného roztoku

byla 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru. Za použití *2-propanolu R1* jako kontrolní tekutiny se ověří, že absorpční maximum roztoku leží v rozmezí 324 nm až 326 nm, a změří se absorbance při 300 nm, 325 nm, 350 nm a 370 nm. Odečtení se opakují při každé vlnové délce několikrát a vypočtou se průměrné hodnoty. Pro každou vlnovou délku λ se vypočte poměr A_λ/A_{325}.

Jestliže jeden nebo více z těchto poměrů převyšuje následující hodnoty: 0,602 při 300 nm, 0,452 při 350 nm, 0,093 při 370 nm, spojené výtřepky se odstraní a celý předcházející postup se opakuje.

Obsah vitaminu *A* v mezinárodních jednotkách v gramu se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_{325} \,.\, V \,.\, 1830}{100m},$$

v němž značí:
A_{325} - absorbanci při 325 nm,
m - hmotnost zkoušeného přípravku v gramech,
V - celkový objem, na který je extrakt ředěn, aby obsahoval 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru,
1830 - faktor k převedení specifické absorbance retinolu na mezinárodní jednotky v gramu.

Uchovávání

V dobře uzavřených, zcela naplněných nádobách, chráněn před světlem, při teplotě 8 °C až 15 °C. Po otevření nádoby by se měl okamžitě její obsah použít; každá nespotřebovaná část obsahu by se měla chránit atmosférou inertního plynu.

Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v gramu,
- název esteru nebo esterů,
- název přidaných stabilizátorů,
- v případě potřeby postup rozpuštění vzniklých krystalů.

† Vitaminum A in aqua dispergibile

Vodná disperze vitaminu A

Je to vodná disperze esteru retinolu (acetat, propionat nebo palmitat) nebo směs těchto esterů připravených synteticky, ke kterým se přidávají vhodné solubilizátory.

Obsahuje nejméně 100 000 m.j. vitaminu A v gramu. Disperze obsahuje 95,0 % až 115,0 % obsahu uvedeného v označení a může obsahovat vhodné stabilizátory jako protimikrobní přísady a antioxidanty.

Vlastnosti

Žlutá nebo nažloutlá kapalina proměnlivé opalescence a viskozity. Vysoce koncentrované roztoky se při nízkých teplotách mohou kalit nebo při pokojové teplotě přecházet v gel.

Zkoušky totožnosti

Do zkumavky se zabroušenou zátkou se vpraví množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 10 000 m.j., přidá se 5 ml *vody R* a zhomogenizuje se. Přidá se 5 ml *lihu 96% R*, 20 ml *pentanu R* a 30 s se silně protřepává. Pak se nechá několik minut stát a pro zkoušky totožnosti se použije supernatantní tekutina, roztok (a).

A. Roztok (a) se zředí *2-propanolem R1* tak, aby jeho absorbance v absorpčním maximu byla v rozmezí 0,3 až 0,7. Roztok vykazuje maximum při 325 nm až 327 nm.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 10 ml roztoku (a) se odpaří do sucha v proudu dusíku. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *cyklohexanu R*.

Porovnávací roztoky. Připraví se porovnávací roztoky v *cyklohexanu R* obsahující asi 5 m.j. v mikrolitru:

a) *retinolacetatu CRL*,

b) *retinolpropionatu CRL*,

c) *retinolpalmitatu CRL*.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a vyvíjí se ihned bez odpaření rozpouštědla směsí objemových dílů *etheru R* a *cyklohexanu R* (20 + 80) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a postříká se *chloridem antimonitým RS*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je modrá skvrna nebo skvrny shodné se skvrnou nebo skvrnami na chromatogramech porovnávacích roztoků a složení zkoušeného roztoku je vyjádřeno skvrnou nebo skvrnami odpovídajícími porovnávacím roztokům (a), (b) a (c).

C. 0,1 ml roztoku (a) se odpaří do sucha v atmosféře dusíku. Zbytek se rozpustí v 1 ml *chloroformu R* a přidá se 5 ml *chloridu antimonitého RS;* ihned vznikne přechodné jasně modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Mísitelnost s vodou. Asi 1 g se smíchá s 10 ml *vody R* předem zahřáté na 50 °C a ochladí se na 20 °C. Ihned po ochlazení vznikne stejnorodá slabě opalizující slabě žlutá disperze.

Příbuzné látky a rozkladné produkty. Použijí se hodnoty absorbance získané při stanovení obsahu. Poměr A_{300}/A_{325} je nejvýše 0,618 a součet hodnot A_{300}/A_{325} a A_{350}/A_{325} je nejvýše 1,060, kde A_{300}, A_{325} a A_{350} jsou absorbance *(2.2.25)* změřené jednotlivě při 300 nm, 325 nm a 350 nm.

Stanovení obsahu

Stanovení obsahu se provede, jak nejrychleji je možné, za ochrany před světlem a přístupu oxidačních látek a nad roztokem je třeba udržovat, pokud je to možné, atmosféru dusíku.

Spektrofotometrická měření se provádějí při 20 °C až 25 °C. Před každou sérií měření se zkontroluje správnost stupnice vlnových délek spektrofotometru *(2.2.25)* a stupnice absorbancí. Absorbance lepených křemenných kyvet naplněných *2-propanolem R1* se nesmí vzájemně lišit o více než 0,002 při každé z vlnových délek 300 nm, 325 nm, 350 nm a 370 nm.

Každé stanovení se provede dvakrát, s použitím vždy zvláštní navážky zkoušeného přípravku.

Přípravek se před stanovením obsahu důkladně promíchá. Množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 50 000 m.j. se odváží s přesností na 0,1 % a vpraví se do baňky. Přidá se 20 ml *ethanolu R*, 1 ml *askorbanu sodného RS* a 3 ml čerstvě připraveného 50% roztoku *hydroxidu draselného R*. Vaří se pod zpětným chladičem na vodní lázni 30 min. Rychle se ochladí, převede

se do dělicí nálevky pomocí dvakrát 15 ml *vody R*, jednou 10 ml *lihu 96% R* a dvakrát 50 ml *pentanu R* a 30 s se intenzivně protřepává. Pak se nechá stát, až se vytvoří dvě čiré vrstvy. Spodní vodně-lihová vrstva se převede do druhé dělicí nálevky a protřepe se směsí 10 ml *lihu 96% R* a 50 ml *pentanu R*. Po oddělení se převede vodně-lihová vrstva do třetí dělicí nálevky a pentanová vrstva do první dělicí nálevky. Druhá dělicí nálevka se promyje dvakrát 10 ml *pentanu R* a výtřepky se přidají do první dělicí nálevky. Vodně-lihová vrstva ve třetí dělicí nálevce se protřepe s 50 ml *pentanu R* a pentanová vrstva se přidá do první dělicí nálevky. Spojené pentanové výtřepky se v první dělicí nálevce promyjí intenzivním protřepáním dvakrát 50 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu R* 10% *(V/V)* a pak se promývají postupně vždy 50 ml *vody R*, až jsou poslední výtřepky neutrální na fenolftalein. Promytý pentanový výtřepek se převede do 250ml odměrné baňky, dělicí nálevka se promyje 10 ml *pentanu R*, který se přidá do odměrné baňky, a její obsah se zředí *pentanem R* na 250,0 ml. Část tohoto roztoku se zředí *2-propanolem R1* tak, aby koncentrace výsledného roztoku byla 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru. Za použití *2-propanolu R1* jako kontrolní tekutiny se ověří, že absorpční maximum roztoku je v rozmezí 324 nm až 326 nm a změří se absorbance při 300 nm, 325 nm, 350 nm a 370 nm. Odečtení se opakují při každé vlnové délce několikrát a vypočtou se průměrné hodnoty. Pro každou vlnovou délku se vypočte poměr $A\ /A_{325}$.

Jestliže tyto poměry jsou vyšší než následující hodnoty: 0,618 při 300 nm, 0,452 při 350 nm, 0,093 při 370 nm, spojené výtřepky se odstraní a celý předcházející postup se opakuje.

Obsah vitaminu *A* v mezinárodních jednotkách v gramu se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{A_{325}\ .\ V\ .\ 1830}{100m},$$

v němž značí:
A_{325} - absorbanci při 325 nm,
m - hmotnost zkoušeného přípravku v gramech,
V - celkový objem, na který je extrakt ředěn, aby obsahoval 10 m.j. až 15 m.j. v mililitru,
1830 - faktor k převedení specifické absorbance retinolu na mezinárodní jednotky v gramu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem, při teplotě uvedené v označení. Po otevření nádoby by se měl okamžitě její obsah použít; každá nespotřebovaná část obsahu by se měla chránit atmosférou inertního plynu.

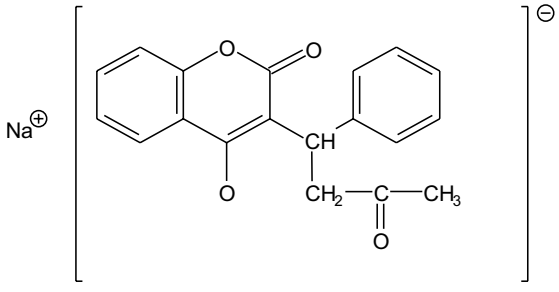
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v gramu,
- název esteru nebo esterů,
- název použitého solubilizátoru a názvy přidaných stabilizátorů,
- teplota uchovávání.

† Warfarinum natricum

Sodná sůl warfarinu



$C_{19}H_{15}NaO_4$ M_r 330,31 CAS 129-06-6

Je to sodná sůl 3-(α-acetonylbenzyl)-4-hydroxykumarinu. Počítáno na bezvodou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{19}H_{15}NaO_4$.

Vlastnosti

Bílý hygroskopický prášek. Je velmi snadno rozpustná ve vodě a v lihu 96%, dobře rozpustná v acetonu, velmi těžce rozpustná v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, D a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1 g se rozpustí v 25 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát se použije ve zkoušce totožnosti E. Sraženina se promyje *vodou R* a usuší se při 100 °C až 105 °C; teplota tání *(2.2.14)* je 159 °C až 163 °C.

B. 1 g se rozpustí v 25 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát se použije ve zkoušce totožnosti E. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* sraženiny se shoduje se spektrem sraženiny připravené současně stejným způsobem za použití *sodné soli warfarinu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidají 2 ml *dichromanu draselného RS1*, 5 min se třepe a nechá se 20 min stát. Při porovnání s kontrolním roztokem získaným při slepé zkoušce roztok není zelenomodrý.

E. Filtrát získaný ve zkoušce totožnosti A nebo B vyhovuje zkoušce (b) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,6 až 8,6; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G-F_{254} R.*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 200 ml.
Porovnávací roztok (b). 40 mg *sodné soli warfarinu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *acenokumarolu CRL* se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (20 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny a na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je zřetelně viditelná skvrna.

Fenolické ketony. 1,25 g se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (50 g/l) a zředí se jím na 10,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* měřená při 385 nm do 15 min po přípravě roztoku není vyšší než 0,20.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 4,0 %; stanoví se s 0,750 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,01 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. 10,0 ml takto zředěného roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 308 nm.

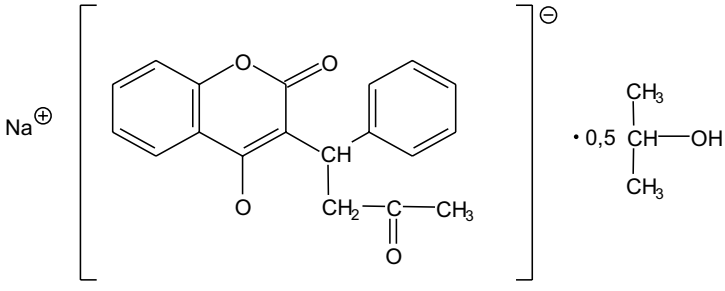
Obsah $C_{19}H_{15}NaO_4$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 431.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněna před světlem.
Separandum.

† Warfarinum natricum clathratum

Klatrát sodné soli warfarinu



CAS 129-06-6 (sodná sůl warfarinu)

Je to klatrát sodné soli 3-(α-acetonylbenzyl)-4-hydroxykumarinu a 2-propanolu (2 : 1), obsahuje 8,0 % až 8,5 % 2-propanolu. Počítáno na bezvodou a 2-propanolu prostou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{19}H_{15}NaO_4$; M_r 330,31.

Vlastnosti

Bílý prášek. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v acetonu, velmi těžce rozpustný v etheru a v dichlormethanu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B, D a E.
Alternativní sestava zkoušek: A, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. 1 g se rozpustí v 25 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát se použije ve zkoušce totožnosti E. Sraženina se promyje *vodou R* a usuší se při 100 °C až 105 °C; teplota tání *(2.2.14)* je 159 °C až 163 °C.

B. 1 g se rozpustí v 25 ml *vody R*, přidají se 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zfiltruje se. Filtrát se použije ve zkoušce totožnosti E. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* sraženiny se shoduje se spektrem sraženiny připravené současně stejným způsobem za použití *sodné soli warfarinu CRL.*

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

D. 1 g se rozpustí v 10 ml *vody R*, přidá se 5 ml *kyseliny dusičné R* a zfiltruje se. K filtrátu se přidají 2 ml *dichromanu draselného RS1*, 5 min se třepe a nechá se 20 min stát. Při porovnání s kontrolním roztokem získaným při slepé zkoušce roztok není zelenomodrý.

E. Filtrát získaný ve zkoušce totožnosti A nebo B vyhovuje zkoušce (b) na sodík *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 1,0 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 20 ml. Roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II).*

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,6 až 8,6; měří se roztok připravený rozpuštěním 1,0 g ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 100 ml.

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G-F_{254} R*.

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Zkoušený roztok (b). 2 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *acetonem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *acetonem R* na 200 ml.
Porovnávací roztok (b). 40 mg *sodné soli warfarinu CRL* se rozpustí v *acetonu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (c). 10 mg *acenokumarolu CRL* se rozpustí v *acetonu R*, přidá se 1 ml zkoušeného roztoku (a) a zředí se *acetonem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 20 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R*, *chloroformu R* a *cyklohexanu R* (20 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,1 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou patrny dvě zřetelně oddělené skvrny a na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) je zřetelně viditelná skvrna.

Fenolické ketony. 1,25 g se rozpustí v roztoku *hydroxidu sodného R* (50 g/l) a zředí se jím na 10,0 ml. Absorbance *(2.2.25)* měřená při 385 nm do 15 min po přípravě roztoku není vyšší než 0,20.

2-propanol. 8,0 % až 8,5 %; provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *1-propanolu R* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 1,0 ml *1-propanolu R* se zředí *vodou R* na 200,0 ml.
Zkoušený roztok (a). 0,250 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 5,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 0,50 g se rozpustí v roztoku vnitřního standardu a zředí se jím na 10,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,50 ml *2-propanolu R* se zředí roztokem vnitřního standardu na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 1,5 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *ethylvinylbenzen-divinylbenzenem kopolymerem R* (125 µm až 150 µm),
- *dusíku pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 40 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 150 °C, teplota nástřikového prostoru se udržuje na 180 °C a teplota detektoru na 200 °C.

Nastříknou se odděleně zvolené objemy zkoušených roztoků a porovnávacího roztoku. Vypočítá se obsah 2-propanolu za použití jeho hustoty při 20 °C, která je 0,785 g/ml.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 2500 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1000 g se rozpustí v *hydroxidu sodném 0,01 mol/l RS* a zředí se jím na 100,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. 10,0 ml takto zředěného roztoku se zředí *hydroxidem sodným 0,01 mol/l RS* na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* v maximu při 308 nm.

Obsah $C_{19}H_{15}NaO_4$ se vypočítá za použití specifické absorbance, která má hodnotu 431.

Uchovávání

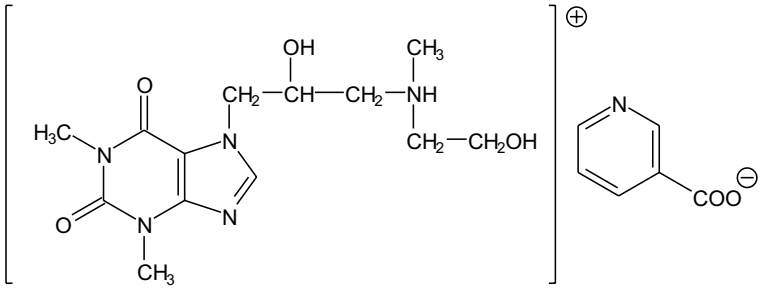
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Xantinoli nicotinas

N

Xanthinoliumnikotinat

Synonymum. Xanthinolium nicotinicum



$C_{19}H_{26}N_6O_6$ M_r 434,45 CAS 437-74-1

Je to N-methyl-N-(2-hydroxyethyl)-N-[3-(1,3-dimethyl-7-xanthinyl)-2-hydroxypropyl]amoniumnikotinat. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,5 % až 101 % sloučeniny $C_{19}H_{26}N_6O_6$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý mikrokrystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%, velmi těžce rozpustný v acetonu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A.
Alternativní sestava zkoušek: B, C a D, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *xanthinoliumnikotinatu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Theofylin a příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) jsou dvě hlavní skvrny, které polohou a velikostí odpovídají hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku (a). Skvrna o R_F asi 0,27 odpovídá kyselině nikotinové a skvrna o R_F asi 0,75 odpovídá xanthinolu.

C. Asi 0,30 g se rozpustí ve 2 ml *vody R* a přidá se 0,1 ml nasyceného roztoku *octanu měďnatého R;* vznikne světle modrá sraženina.

D. Asi 10 mg vyhovuje zkoušce na xanthiny (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,50 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý (*2.2.1*) a bezbarvý (*2.2.2, Metoda II*).

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,8 až 6,8; měří se roztok S.

Theofylin a příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 1,25 g *xanthinoliumnikotinatu CRL* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 50 mg *theofylinu R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 100 ml.
Porovnávací roztok (c). 25 mg *kyseliny nikotinové R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 100 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese po 4 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a) a po 2 μl porovnávacího roztoku (b) a porovnávacího roztoku (c) a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *chloroformu R* a *1-butanolu R* (6 + 6 + 11 + 12) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku skvrna odpovídající theofylinu není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %) a žádná skvrna, kromě dvou hlavních skvrn a skvrny odpovídající theofylinu, není intenzivnější než skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,1 %).

Sírany (*2.4.14*) 15 ml roztoku S vyhovuje zkoušce na sírany (150 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní porovnávací roztok (*10 μg SO_4/ml*).

Těžké kovy (*2.4.8*). 12 ml roztoku S vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (20 μg/g). K přípravě porovnávacího roztoku se použije základní *roztok olova (1 μg Pb/ml)*.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel (*2.4.14*). Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

0,1200 g se rozpustí ve 30 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 25 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*) do třetího inflexního bodu. Provede se slepá zkouška.

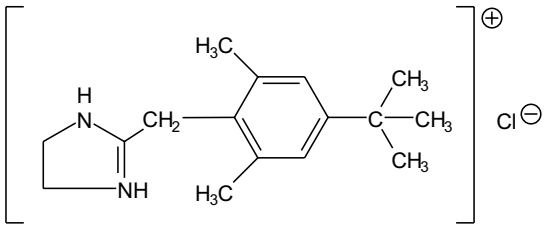
1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,01448 g $C_{19}H_{26}N_6O_6$.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Xylometazolini hydrochloridum

Xylometazoliniumchlorid



$C_{16}H_{25}ClN_2$ M_r 280,84 CAS 1218-35-5

Je to 2-(4-terc.butyl-2,6-dimethylbenzyl)-2-imidazoliniumchlorid. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{16}H_{25}ClN_2$.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, v lihu 96% a v methanolu, prakticky nerozpustný v etheru.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: A a E.
Alternativní sestava zkoušek: B, C, D a E, viz Obecné zásady (1.2).

A. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *xylometazoliniumchloridu CRL.*

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Příbuzné látky, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) se polohou, barvou a velikostí shoduje s hlavní skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Asi 0,5 mg se rozpustí v 1 ml *methanolu R* a přidá se 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku *nitroprussidu sodného R* (50 g/l) a 0,5 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (20 g/l). Nechá se 10 min stát a přidá se 1 ml roztoku *uhličitanu sodného R* (80 g/l); vznikne fialové zbarvení.

D. 0,2 g se rozpustí v 1 ml *vody R*, přidá se 2,5 ml *lihu 96% R* a 2 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS.* Důkladně se zamíchá a pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Roztok nevykazuje žádnou fluorescenci nebo nefluoreskuje intenzivněji než kontrolní roztok připravený současně stejným způsobem. Zkoušku lze hodnotit, jestliže roztok připravený současně stejným způsobem za použití *nafazoliniumchloridu CRL* místo zkoušené látky fluoreskuje zřetelně modře.

E. Vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1).*

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 0,25 g se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 25 ml, pak se přidá 0,1 ml *červeně methylové RS* a 0,1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l VS;* roztok je červený. Ke změně zbarvení indikátoru na žluté se spotřebuje nejvýše 0,2 ml *hydroxidu sodného 0,01 mol/l VS.*

Příbuzné látky. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok (a). 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Zkoušený roztok (b). 1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *xylometazoliniumchloridu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5 ml.
Porovnávací roztok (b). 4 mg *xylometazolinu nečistoty A CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50 ml.
Porovnávací roztok (c). 1 ml zkoušeného roztoku (b) se zředí *methanolem R* na 50 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 5 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R* a *methanolu R* (5 + 100) po dráze 10 cm a nechá se usušit. Na dno chromatografické komory se umístí odpařovací miska obsahující směs objemových dílů *vody R, kyseliny chlorovodíkové R1* a roztoku *manganistanu draselného R* (15 g/l) (1 + 1 + 2), komora se uzavře a nechá se 15 min stát. Suchá vrstva se vloží na 5 min do komory nasycené parami chloru a komora se opět uzavře. Pak se vrstva vyjme a vystaví se působení proudu studeného vzduchu tak dlouho, až je chlor odstraněn a až část vrstvy pod startem nereaguje s kapkou *škrobu s jodidem draselným RS* za vzniku modrého zbarvení. Vrstva se postříká *škrobem s jodidem draselným RS;* na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna odpovídající xylometazolinu nečistotě A není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,2 %); na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) žádná skvrna, kromě hlavní skvrny a skvrny odpovídající xylometazolinu nečistotě A, není intenzivnější než hlavní skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) (0,2 %).

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 0,5 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

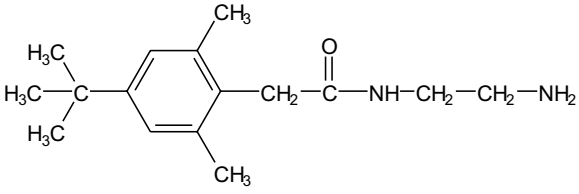
0,200 g se rozpustí ve 25 ml *kyseliny octové bezvodé R*, přidá se 10 ml *acetanhydridu R* a titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,08 mg $C_{16}H_{25}ClN_2$.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty

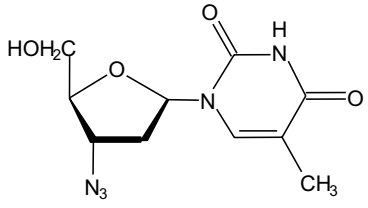


A. N-(2-aminoethyl)-2-(4-terc.butyl-2,6-dimethylfenyl)acetamid.

2908

† Zidovudinum

Zidovudin



$C_{10}H_{13}N_5O_4$ M_r 267,24 CAS 30516-87-1

Je to 1-(3-azido-2,3-dideoxy-β-D-*ribo*-furanosyl)-5-methylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 97,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{10}H_{13}N_5O_4$.

Vlastnosti

Bílý nebo nahnědlý prášek. Je mírně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v ethanolu.
Taje při asi 124 °C.
Vykazuje polymorfismus.

Zkoušky totožnosti

Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* zkoušené látky se shoduje se spektrem *zidovudinu CRL*. Pokud se spektra získaná v pevném stavu liší, rozpustí se odděleně zkoušená látka i referenční látka v minimálním množství *vody R*, odpaří se do sucha v exsikátoru pod vakuem nad *oxidem fosforečným R* a se zbytky se zaznamenají nová spektra.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. 0,5 g se rozpustí, je-li třeba zahřátím, v 50 ml *vody R*. Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $HŽ_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Specifická optická otáčivost *(2.2.7)*. +60,5° až +63,0°, počítáno na vysušenou látku; měří se při 25 °C roztok připravený rozpuštěním 0,50 g v *ethanolu R* a zředěním stejným rozpouštědlem na 50,0 ml.

Příbuzné látky.

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy vhodného silikagelu s fluorescenčním indikátorem pro detekci při 254 nm.

Zkoušený roztok. 0,20 g se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok (a). 20 mg *thyminu R*, 20 mg *zidovudinu nečistoty A CRL* a 20 mg *trifenylmethanolu R* se rozpustí v *methanolu R,* přidá se 1,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se *methanolem R* na 100 ml.
Porovnávací roztok (b). 5,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *methanolu R* a *dichlormethanu R* (10 + 90) po dráze 12 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná

skvrna odpovídající zidovudinu nečistotě A není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %) a žádná skvrna, kromě hlavní skvrny, skvrny odpovídající zidovudinu nečistotě A a thyminu (který je stanoven za použití kapalinové chromatografie), není intenzivnější než skvrna odpovídající zidovudinu na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Vrstva se postříká roztokem *vanilinu R* (10 g/l) v *kyselině sírové R*. Na chromatogramu zkoušeného roztoku žádná skvrna odpovídající trifenylmethanolu není intenzivnější než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,5 %). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) jsou patrny čtyři zřetelně od sebe oddělené skvrny odpovídající thyminu, zidovudinu nečistotě A, zidovudinu a trifenylmethanolu v pořadí dle stoupající hodnoty R_F.

B. Provede se kapalinová chromatografie, jak je popsáno ve zkoušce Stanovení obsahu. Nastříkne se odděleně po 10 µl zkoušeného roztoku (a), porovnávacího roztoku (b), porovnávacího roztoku (d) a porovnávacího roztoku (e). Chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a). Při zaznamenání chromatogramů za předepsaných podmínek jsou jednotlivé látky eluovány v následujícím pořadí: thymin, zidovudin a zidovudin nečistota B. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku odpovídající thyminu není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (2 %); plocha žádného píku odpovídajícího zidovudinu nečistotě B není větší než plocha odpovídajícího píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (d) (1 %); plocha žádného dalšího píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (0,5 %). Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než 6násobek plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e) (3,0 %). Nepřihlíží se k píkům, jejichž plocha je menší než 10 % plochy píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (e).

Těžké kovy *(2.4.8)*. 1,00 g vyhovuje limitní zkoušce D na těžké kovy (20 µg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml)*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,25 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok (a). 50,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Zkoušený roztok (b). 10,0 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 10,0 mg *zidovudinu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 10,0 mg *thyminu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 5 mg *zidovudinu nečistoty B CRL* se rozpustí v 25,0 ml porovnávacího roztoku (a) a zředí se mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (d). 5,0 ml porovnávacího roztoku (c) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.
Porovnávací roztok (e). 0,25 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí mobilní fází na 50,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),

- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a *vody R* (20 + 80), s průtokovou rychlostí 1,2 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 265 nm.

Při průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min se kolona promývá do ustavení rovnováhy po dobu asi 45 min. Nastříkne se 10 μl porovnávacího roztoku (c). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky hlavních píků na chromatogramu byly nejméně 70 % celé stupnice zapisovače. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píkem zidovudinu a zidovudinu nečistoty B je nejméně 1,0. Nastříkne se odděleně 10 μl zkoušeného roztoku (b) a 10 μl porovnávacího roztoku (a). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky hlavních píků na chromatogramech byly nejméně 50 % celé stupnice zapisovače.

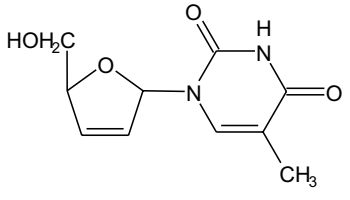
Obsah $C_{10}H_{13}N_5O_4$ se vypočítá z ploch píků a z deklarovaného obsahu *zidovudinu CRL*.

Uchovávání

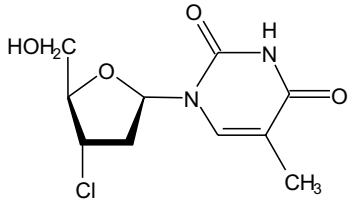
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

Separandum.

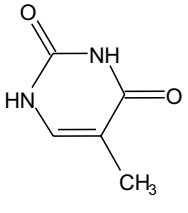
Nečistoty



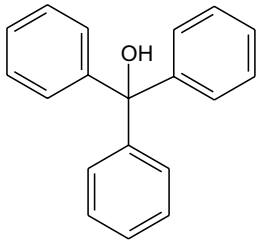
A. 1-[(2*R*,5*S*)-5-hydroxymethyl-2,5-dihydro-2-furyl]-5-methylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion,



B. 1-(3-chlor-2,3-dideoxy-β-D-*ribo*-furanosyl)-5-methylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion,



C. thymin,



D. trifenylmethanol.

† Zinci chloridum

Chlorid zinečnatý

$ZnCl_2$ M_r 136,29 CAS 7646-85-7

Obsahuje 95,0 % až 100,5 % sloučeniny $ZnCl_2$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bílé tyčinkovité odlitky, rozplývající se na vzduchu. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96% a v glycerolu.

Zkoušky totožnosti

A. 0,5 g se rozpustí v *kyselině dusičné zředěné RS* a zředí se jí na 10 ml. Roztok vyhovuje zkoušce (a) na chloridy *(2.3.1)*.

B. 5 ml roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na zinek *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 2,0 g se přidá 38 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* připravené z *vody destilované R* a po kapkách se přidává *kyselina chlorovodíková zředěná RS* až do úplného rozpuštění. Roztok se zředí *vodou prostou oxidu uhličitého R* připravenou z *vody destilované R* na 40 ml.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,6 až 5,5. Měří se následující roztok: 1,0 g se rozpustí v 9 ml *vody prosté oxidu uhličitého R;* roztok může být slabě zakalen.

Chlorid-oxidy. 1,5 g se rozpustí v 1,5 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)*. Po přidání 7,5 ml *lihu 96% R* se roztok může do 10 min zakalit. Zákal zmizí po přidání 0,2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*.

Sírany *(2.4.13)*. 5 ml roztoku S zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (200 μg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 5 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 10 ml *vody destilované R*.

Hliník, vápník, těžké kovy, železo, hořčík. K 8 ml roztoku S se přidají 2 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se. Vzniklý roztok je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*. Po přidání 1 ml *hydro-*

genfosforečnanu sodného RS zůstane roztok nejméně 5 min čirý. Po přidání 0,2 ml *sulfidu sodného RS* vznikne bílá sraženina, supernatantní tekutina zůstane bezbarvá.

Amonium *(2.4.1)*. 0,5 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na amonium (400 μg/g).

Stanovení obsahu

0,250 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové zředěné RS*. Provede se chelatometrická titrace zinku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 13,63 mg $ZnCl_2$.

Uchovávání

V nekovových dobře uzavřených obalech.
Separandum.

Zinci oxidum

Oxid zinečnatý

Synonymum. Zincum oxydatum

ZnO M_r 81,38 CAS 1314-13-2

Počítáno na vyžíhanou látku, obsahuje 99,0 % až 100,5 % sloučeniny ZnO.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý jemný amorfní prášek bez hrubých částic. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Zkoušky totožnosti

A. Při intenzivním zahřívání žloutne, žluté zbarvení po ochlazení mizí.

B. 0,1 g se rozpustí v 1,5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 5 ml. Roztok vyhovuje zkoušce na zinek *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Zásaditě reagující látky. 1,0 g se protřepe s 10 ml vroucí *vody R*, přidá se 0,1 ml *fenolftaleinu RS* a zfiltruje se. Pokud je filtrát červeně zbarven, spotřebuje se nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* ke změně zbarvení indikátoru.

Uhličitany a látky nerozpustné v kyselinách. 1,0 g se rozpustí v 15 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Rozpouštění probíhá bez šumění a vzniklý roztok neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a je bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Arsen *(2.4.2)*. 0,2 g vyhovují limitní zkoušce A na arsen (5 μg/g).

Kadmium. Nejvýše 10 μg Cd/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 2,0 g se rozpustí ve 14 ml směsi stejných objemových dílů *vody R* a *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R*. Vaří se 1 min, pak se ochladí a zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se zředěním základního *roztoku kadmia (0,1 % Cd)* roztokem *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R* 3,5% (*V/V*).

Měří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen nebo vzduch-propan.

Železo *(2.4.9)*. 50 mg se rozpustí v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a zředí se *vodou R* na 10 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na železo (200 μg/g). Použije se 0,5 ml *kyseliny thioglykolové R*.

Olovo. Nejvýše 50 μg Pb/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 5,0 g se rozpustí ve 24 ml směsi stejných objemových dílů *vody R* a *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R*. Vaří se 1 min, pak se ochladí a zředí *vodou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se zředěním základního *roztoku olova (0,1 % Pb)* roztokem *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R* 3,5% (*V/V*).

Měří se absorbance při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

V závislosti na přístroji může být měření provedeno při 217,0 nm.

Ztráta žíháním. Nejvýše 1,0 %, 1,00 g se žíhá při 500 °C.

Stanovení obsahu

0,150 g se rozpustí v 10 ml *kyseliny octové zředěné RS* a provede se chelatometrická titrace zinku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,14 mg ZnO.

Zinci stearas

Stearan zinečnatý

CAS 557-05-1

Stearan zinečnatý [$(C_{17}H_{35}COO)_2Zn$; M_r 632,33] může obsahovat palmitan zinečnatý [$(C_{15}H_{31}COO)_2Zn$; M_r 576,22] a olejan zinečnatý [$(C_{17}H_{33}COO)_2Zn$; M_r 628,29] v nestálém poměru. Obsahuje 10,0 % až 12,0 % Zn.

Vlastnosti

Lehký bílý amorfní prášek bez hrubých částic. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu a v etheru.

Zkoušky totožnosti

A. Odparek získaný při přípravě roztoku S, viz Zkoušky na čistotu, má teplotu tuhnutí *(2.2.18)* nejméně 53 °C.

B. 5 ml roztoku S se zneutralizuje *hydroxidem sodným koncentrovaným RS* na *papír lakmusový červený R;* roztok vyhovuje zkoušce na zinek *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. K 5,0 g se přidá 50 ml *etheru R* a 40 ml roztoku *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R* 7,5% (*V/V*) ve *vodě destilované R* a zahřívá se pod zpětným chladičem až do úplného rozpuštění. Po ochlazení se v dělicí nálevce oddělí vodná vrstva a etherová vrstva se dvakrát protřepe 4 ml *vody destilované R*. Spojené vodné vrstvy se po promytí 15 ml *etheru R* zahřívají na vodní lázni až do úplného odpaření etheru. Po ochlazení se zředí na 50,0 ml *vodou destilovanou R* (roztok S). Etherová vrstva se odpaří a odparek se vysuší při 105 °C.

Vzhled roztoku. Roztok S není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_6$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Vzhled roztoku mastných kyselin. 0,5 g odparku získaného při přípravě roztoku S se rozpustí v 10 ml *chloroformu R*. Roztok je čirý *(2.2.1)* a není intenzivněji zbarven než porovnávací barevný roztok $Ž_5$ *(2.2.2, Metoda II)*.

Kysele nebo zásaditě reagující látky. 1,0 g se protřepe s 5 ml *lihu 96% R* a přidá se 20 ml *vody prosté oxidu uhličitého R* a 0,1 ml *červeně fenolové RS*. Ke změně zbarvení indikátoru se spotřebuje nejvýše 0,3 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* nebo 0,1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS*.

Číslo kyselosti mastných kyselin *(2.5.1)*. 195 až 210; stanoví se za použití 0,20 g odparku získaného při přípravě roztoku S, rozpuštěného ve 25 ml předepsané směsi rozpouštědel.

Chloridy *(2.4.4)*. 2 ml roztoku S zředěného na 15 ml *vodou R* vyhovují limitní zkoušce na chloridy (250 μg/g).

Sírany *(2.4.13)*. 1 ml roztoku S se zředí *vodou destilovanou R* na 50 ml. 12,5 ml tohoto roztoku zředěného *vodou destilovanou R* na 15 ml vyhovuje limitní zkoušce na sírany (0,6 %).

Kadmium. Nejvýše 5 μg Cd/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 20,0 ml roztoku S se zředí roztokem *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R* 3,5% (*V/V*) na 50,0 ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se zředěním základního *roztoku kadmia (0,1 % Cd)* roztokem *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R* 3,5% (*V/V*).

Měří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen nebo vzduch-propan.

Olovo. Nejvýše 25 μg Pb/g; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok S.
Porovnávací roztoky. Připraví se zředěním základního *roztoku olova (0,1 % Pb)* roztokem *kyseliny dusičné prosté kadmia a olova R* 3,5% (*V/V*).

Měří se absorbance při 283,3 nm za použití olověné lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

V závislosti na přístroji může být měření provedeno při 217,0 nm.

Stanovení obsahu

K 1,000 g se přidá 50 ml *kyseliny octové zředěné RS* a vaří se nejméně 10 min, nebo dokud není vrstva mastných kyselin čirá. Podle potřeby se doplní *vodou R* na původní objem, ochladí se

a zfiltruje. Filtr a baňka se promývají *vodou R* až do vymizení kyselé reakce na *papír modrý lakmusový R*. Filtrát a promývací vody se spojí a provede se chelatometrická titrace zinku *(2.5.11)*. 1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 6,54 mg Zn.

Zinci sulfas heptahydricus

Síran zinečnatý

Synonyma. Zinci sulfas, Zincum sulfuricum

$ZnSO_4 . 7H_2O$ M_r 287,54 CAS 7446-20-0

Je to heptahydrát síranu zinečnatého. Obsahuje 99,0 % až 104,0 % sloučeniny $ZnSO_4 . 7H_2O$.

Vlastnosti

Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé průsvitné krystaly, zvětrávající. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v lihu 96%.

Zkoušky totožnosti

A. Roztok S, viz Zkoušky na čistotu, vyhovuje zkoušce na sírany *(2.3.1)*.

B. Roztok S vyhovuje zkoušce na zinek *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 2,5 g se rozpustí ve *vodě prosté oxidu uhličitého R* a zředí se jí na 50 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S je čirý *(2.2.1)* a bezbarvý *(2.2.2, Metoda II)*.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,4 až 5,6; měří se roztok S.

Chloridy *(2.4.4)*. 3,3 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 15 ml vyhovují limitní zkoušce na chloridy (300 μg/g).

Železo *(2.4.9)*. 2 ml roztoku S zředěného *vodou R* na 10 ml vyhovují limitní zkoušce na železo (100 μg/g). Použije se 0,5 ml *kyseliny thioglykolové R*.

Stanovení obsahu

0,500 g se rozpustí v 5 ml *kyseliny octové zředěné RS* a provede se chelatometrická titrace zinku *(2.5.11)*.

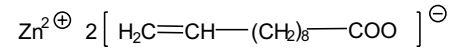
1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 28,75 mg $ZnSO_4 . 7H_2O$.

Uchovávání

V nekovových dobře uzavřených obalech.

Zinci undecylenas

Undecylenan zinečnatý



$C_{22}H_{38}O_4Zn$ M_r 431,92 CAS 557-08-4

Je to zinečnatá sůl kyseliny 10-undecenové. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 98,0 % až 102,0 % sloučeniny $C_{22}H_{38}O_4$ Zn.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý jemný prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v etheru. Taje při 116 °C až 121 °C, ale v tavenině může zůstat malý zbytek pevné látky.

Zkoušky totožnosti

A. K 2,5 g se přidá 10 ml *vody R* a 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a protřepe se dvakrát 10 ml *etheru R*. Vodná vrstva se uchovává pro zkoušku C. Spojené etherové vrstvy se promyjí *vodou R* a odpaří se do sucha. K odparku se přidají 2 ml čerstvě destilovaného *anilinu R* a 10 min se vaří pod zpětným chladičem. Nechá se ochladit, přidá se 30 ml *etheru R* a protřepe se třikrát 20 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a jednou 20 ml *vody R*. Organická vrstva se odpaří do sucha na vodní lázni, odparek se dvakrát rekrystalizuje z *lihu R* 70% *(V/V)* a suší se 3 h ve vakuu. Taje (*2.2.14*) při 66 °C až 68 °C.

B. 0,1 g se rozpustí ve směsi 2 ml *kyseliny sírové zředěné RS* a 5 ml *kyseliny octové ledové R* a po kapkách se přidá 0,25 ml *manganistanu draselného RS*. Roztok manganistanu draselného se odbarví.

C. Směs 1 ml vodné vrstvy ze zkoušky A a 4 ml *vody R* vyhovuje zkoušce na zinek *(2.3.1)*.

Zkoušky na čistotu

Zásaditě reagující látky. K 1,0 g se přidá 5 ml *lihu 96% R*, 0,5 ml *červeně fenolové RS* a 50 ml *vody prosté oxidu uhličitého R*. Roztok se nezbarví červeně.

Alkalické kovy a kovy alkalických zemin. K 1,0 g se přidá 25 ml *vody R* a 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* a zahřeje se k varu. Za horka se filtruje, zbytek na filtru se promyje 25 ml horké *vody R*. Filtrát a promývací tekutina se spojí a zalkalizují *amoniakem 26% R*. Přidá se 7,5 ml *thioacetamidu RS* a zahřívá se 30 min na vodní lázni. Zfiltruje se a sraženina se promyje dvakrát 10 ml *vody R*. Filtrát a promývací tekutiny se spojí, na vodní lázni se odpaří do sucha a odparek se vyžíhá. Zbytek váží nejvýše 20 mg (2 %).

Sírany *(2.4.13)*. K 0,1 g se přidá směs 2 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 10 ml *vody destilované R* a zahřeje se k varu. Ochladí se, zfiltruje a filtrát se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (500 μg/g). Porovnávací roztok se připraví za použití 5 ml základního *roztoku síranů (10 μg SO_4/ml)* a 10 ml *vody destilované R*.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 1,5 %; suší se 0,500 g v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stupeň nenasycenosti. 0,100 g se rozpustí ve směsi 5 ml *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS* a 30 ml *kyseliny octové ledové R*. Titruje se *bromičnanem draselným 0,0167 mol/l VS*. Před koncem titrace se přidá 0,05 ml *ethoxychrysoidiniumchloridu RS* jako indikátor a titruje se do vymizení červeného zbarvení.

Spotřeba *bromičnanu draselného 0,0167 mol/l VS* je 9,1 ml až 9,4 ml.

Stanovení obsahu

K 0,350 g se přidá 25 ml *kyseliny octové zředěné RS* a zahřeje se k varu. Provede se chelatometrická titrace zinku *(2.5.11)*.

1 ml *edetanu disodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 43,19 mg $C_{22}H_{38}O_4Zn$.

Uchovávání

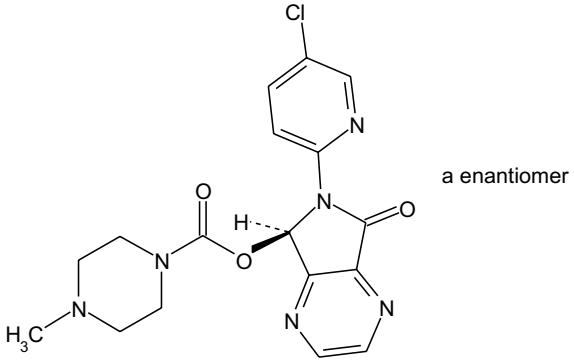
V dobře uzavřených obalech, chráněn před světlem.

---

† Zopiclonum

Zopiklon

1998



$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$ M_r 388,81 CAS 43200-80-2

Je to (5*RS*)-6-(5-chlorpyrid-2-yl)-6,7-dihydro-7-oxo-5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-5-yl-4-methylpiperazin-1-karboxylat. Počítáno na látku prostou rozpouštědel, obsahuje 98,5 % až 100,5 % sloučeniny $C_{17}H_{17}ClN_6O_3$.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v dichlormethanu, mírně rozpustný v acetonu a prakticky nerozpustný v lihu 96%. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách.

Taje při asi 177 °C, za rozkladu.

Zkoušky totožnosti

Základní sestava zkoušek: B.
Alternativní sestava zkoušek: A a C, viz Obecné zásady (1.2).

A. 50,0 mg se rozpustí v roztoku *kyseliny chlorovodíkové R* (3,5 g/l) a zředí se jí na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se zředí roztokem *kyseliny chlorovodíkové R* (3,5 g/l) na 100,0 ml. Měří se absorbance *(2.2.25)* roztoku při 220 nm až 350 nm; roztok vykazuje absorpční maximum při 303 nm. Specifická absorbance v maximu je 340 až 380.

B. Infračervené absorpční spektrum *(2.2.24)* tablety zkoušené látky se shoduje se spektrem tablety *zopiklonu CRL.*

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu* GF_{254} *R*.

Zkoušený roztok. 10 mg se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.
Porovnávací roztok. 10 mg *zopiklonu CRL* se rozpustí v *dichlormethanu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 10 µl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *triethylaminu R*, *acetonu R* a *ethylacetatu R* (2 + 50 + 50) po dráze 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pozoruje se v ultrafialovém světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá svou polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Roztok S. 1,0 g se rozpustí v *dimethylformamidu R* a zředí se jím na 20,0 ml.

Vzhled roztoku. Roztok S neopalizuje intenzivněji než porovnávací suspenze II *(2.2.1)* a není zbarven intenzivněji než nejpodobnější porovnávací barevný roztok intenzity 5 *(2.2.2, Metoda II)*.

Optická otáčivost *(2.2.7)*. -0,05° až +0,05°; měří se roztok připravený zředěním 10,0 ml roztoku S *dimethylformamidem R* na 50,0 ml.

Příbuzné látky. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*. *Roztoky se připraví těsně před použitím.*

Zkoušený roztok. 40,0 mg se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (a). 3,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 1,0 ml zkoušeného roztoku se zředí mobilní fází na 100,0 ml. 1,0 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 10,0 ml.
Porovnávací roztok (c). 10,0 mg *zopiklonoxidu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 25,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 1,0 ml zkoušeného roztoku a zředí se mobilní fází na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *acetonitrilu R* a roztoku obsahujícího 8,1 g/l *laurylsíranu sodného R* a 1,6 g/l *dihydrogenfosforečnanu sodného R* upraveného na hodnotu pH 3,5 přidáním roztoku *kyseliny fosforečné R* 10% *(V/V)* (38 + 62). Průtoková rychlost je 1,5 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 303 nm.

Teplota kolony se udržuje na 30 °C.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (c). Nastaví se citlivost detektoru tak, aby výšky dvou hlavních píků na chromatogramu byly nejméně 30 % celé stupnice zapisovače. Při zaznamenání chromatogramu za předepsaných podmínek je retenční čas zopiklonu 27 min až 31 min. Pokud je to nutné, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi (se stoupající koncentrací klesají retenční časy a s klesající koncentrací retenční časy stoupají). Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) je rozlišení mezi píkem zopiklonoxidu a píkem zopiklonu nejméně 3,0. Pokud se nedosáhne požadovaného rozlišení, upraví se hodnota pH mobilní fáze na 4,0 roztokem *kyseliny fosforečné R* 10% *(V/V)*.

Nastříkne se 20 µl zkoušeného roztoku, 20 µl porovnávacího roztoku (a), 20 µl porovnávacího roztoku (b) a chromatogramy se zaznamenávají po dobu odpovídající 1,5násobku retenčního času zopiklonu. Na chromatogramu zkoušeného roztoku není plocha žádného píku, kromě hlavního píku, větší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (0,3 %), a nejvýše dva takové píky mohou mít plochu větší, než je plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) (0,1 %).

2-propanol. Nejvýše 0,7 %; provede se plynová chromatografie *(2.2.28)* za použití *ethanolu R1* jako vnitřního standardu.

Roztok vnitřního standardu. 5 ml *ethanolu R1* se zředí *dichlorethanem R* na 100 ml. 1 ml tohoto roztoku se zředí *dichlorethanem R* na 10 ml.
Zkoušený roztok. 0,25 g se rozpustí v *dichlorethanu R*, přidá se 0,5 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlorethanem R* na 5,0 ml.
Porovnávací roztok. 4,5 ml *2-propanolu R* se zředí *dichlorethanem R* na 100,0 ml. K 1,0 ml tohoto roztoku se přidá 10,0 ml roztoku vnitřního standardu a zředí se *dichlorethanem R* na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kapilární křemenné kolony délky 10 m a vnitřního průměru asi 0,53 mm s 20µm vrstvou *styrendivinylbenzen-kopolymeru R*,
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu při průtokové rychlosti 4 ml/min,
- plamenoionizačního detektoru,
- následujícího teplotního programu:

Místo	Čas (min)	Teplota (°C)	Rychlost (°C/min)	Poznámka
kolona	0 - 5 5 - 10 10 - 14 14 - 20,5 20,5 - 27,5	50 50 → 70 70 70 → 200 200	- 4 - 20 -	izotermicky lineární gradient izotermicky lineární gradient izotermicky
nástřik		150		
detektor		250		

Nastříkne se 1 µl zkoušeného roztoku a 1 µl porovnávacího roztoku. Vypočítá se obsah 2-propanolu v procentech za použití jeho hustoty při 20 °C, která je 0,785 g/ml.

Těžké kovy *(2.4.8).* 1,0 g vyhovuje limitní zkoušce C na těžké kovy (20 µg/g). Připraví se porovnávací roztok za použití 2 ml základního *roztoku olova (10 µg Pb/ml).*

Síranový popel *(2.4.14)*. Nejvýše 0,1 %; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

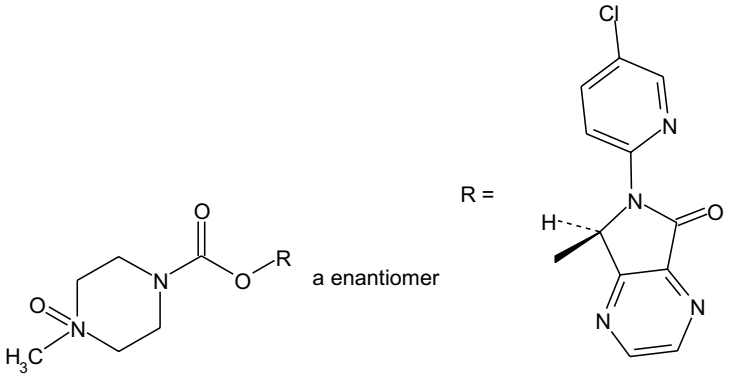
0,300 g se rozpustí ve směsi 10 ml *kyseliny octové R* a 40 ml *acetanhydridu R*. Titruje se *kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence *(2.2.20)*.

1 ml *kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS* odpovídá 38,88 mg $C_{17}H_{17}ClN_6O_3$.

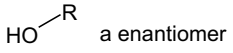
Uchovávání

Chráněn před světlem.
Separandum.

Nečistoty



A. 4-oxid(5*RS*)-6,7-dihydro-6-(5-chlorpyridin-2-yl)-7-oxo-5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-5-ylmethylpiperazin-1-karboxylatu (oxid zopiklonu),



B. (7*RS*)-6,7-dihydro-7-hydroxy-6-(5-chlorpyridin-2-yl)-5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-5-on,

C. 6,7-dihydro-6-(5-chlorpyridin-2-yl)-5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-5-on.

2922

6.2 Léčivé přípravky

6.2.1 Obecné články lékových forem

Auricularia

Ušní přípravky

Jsou to tekuté, polotuhé nebo tuhé přípravky určené pro vkapávání, rozprašování, insuflaci a aplikaci do zevního zvukovodu nebo k ušnímu výplachu.

Ušní přípravky obvykle obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu. Mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě osmotického tlaku nebo viskozity, úpravě nebo stabilizaci hodnoty pH, ke zvýšení rozpustnosti účinných látek, stabilizaci přípravku nebo k zajištění odpovídajících protimikrobních vlastností. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě léčebný účinek přípravku a v používaných koncentracích nejsou příčinou toxicity nebo přílišné místní dráždivosti.

Přípravky pro aplikaci do poškozeného ucha, obzvláště pokud je perforován ušní bubínek nebo jsou-li aplikovány před chirurgickým zákrokem, jsou sterilní, bez protimikrobních přísad a jsou dodávány v jednodávkových obalech.

Pokud není předepsáno a schváleno jinak, vodné ušní přípravky dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobní přísady ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti.

Obaly pro ušní přípravky obvykle vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů ušních přípravků:
- ušní kapky a spreje,
- polotuhé ušní přípravky,
- zásypy do ucha,
- ušní omývadla,
- ušní tampony s léčivy.

Výroba

Při vývoji ušního přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení ochranných vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních látek (*5.1.3*).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci ušních přípravků je vhodným způsobem zajištěna jejich mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Sterilní ušní přípravky jsou vyráběny za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při výrobě ušních přípravků obsahujících dispergované částice se používají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Je-li přípravek sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název jednotlivých protimikrobních přísad,
- zda je přípravek sterilní.

Otoguttae, Praeparata auricularia pro aerodispersione

Ušní kapky, ušní spreje
Synonyma. Kapky do ucha, Aerodispersiones auriculares

Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze jedné nebo více léčivých látek v kapalině (např. ve vodě, v glykolu nebo v oleji) vhodné k aplikaci do zevního zvukovodu, bez nežádoucího tlaku na ušní bubínek. Mohou být aplikovány do zvukovodu také jako tekutinou napuštěný tampon.

Emulze mohou vykazovat oddělování fází, ale jsou snadno protřepáním znovu homogenizovatelné. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno protřepáním rozptýlit; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Ušní kapky a spreje jsou obvykle dodávány ve vícedávkových obalech opatřených vhodným aplikátorem. Pokud jsou spreje dodávány v tlakových obalech, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu*.

Auricularia semisolida

Polotuhé ušní přípravky

Jsou určeny k aplikaci do zevního zvukovodu, v případě potřeby jako tampon napuštěný přípravkem.

Polotuhé ušní přípravky vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Unguenta*.

Jsou dodávány v obalech doplněných vhodným aplikátorem.

Pulveres auriculares

Zásypy do ucha
Synonymum. Prášky do ucha

Vyhovují požadavkům článku *Pulveres adspersorii.*

Jsou dodávány v obalech s vhodným zařízením umožňujícím aplikaci nebo insuflaci.

Lotiones auriculares
Ušní omývadla

Jsou to přípravky určené k očištění zevního zvukovodu, obvykle jako vodné roztoky s hodnotou pH ve fyziologickém rozmezí.

Ototampona medicata
Ušní tampony s léčivy

Jsou určeny k aplikaci do zevního zvukovodu. Vyhovují požadavkům článku *Tampona medicata.*

Capsulae

Tobolky

Synonymum. Kapsle

Požadavky tohoto článku se netýkají nutně tobolek určených pro jiné než perorální podání. Požadavky vztahující se na tyto přípravky lze nalézt v jiných článcích, např. Rectalia a Vaginalia.

Jsou to tuhé přípravky s tvrdými nebo měkkými obaly různých tvarů a velikostí, obvykle obsahující jednu dávku léčivé látky. Jsou určeny pro perorální podání.

Obaly tobolek jsou vyráběny z želatiny nebo jiných látek, jejich konzistence se může upravovat přídavkem glycerolu nebo sorbitolu a podobných látek. Lze používat pomocné látky, jako jsou povrchově aktivní látky, opakní přísady, protimikrobní látky, sladidla, barviva schválená oprávněnou autoritou a chuťové a aromatické přísady. Tobolky mohou být na povrchu označené.

Obsah tobolek může mít tuhou, tekutou nebo polotuhou konzistenci. Obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami (nebo bez nich), jako jsou rozpouštědla, plniva, látky kluzné a rozvolňovadla. Obsah tobolek nezpůsobuje narušení obalu. Obal tobolek je však narušován trávicími šťávami, přičemž se uvolní obsah tobolek.

Obaly pro tobolky obvykle vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly *(3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů tobolek:
- tvrdé tobolky,
- měkké tobolky,
- enterosolventní tobolky,
- tobolky s řízeným uvolňováním.

Výroba

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci tobolek se používá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků *(5.1.4)*.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, tobolky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo nižším než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám. Zkouška se nevztahuje na přípravky multivitaminové a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Tobolky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené účinné látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Disoluce. Použije se jedna ze zkoušek ve stati Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem (*2.9.3*).

Je-li předepsána zkouška disoluce, neprovádí se zkouška rozpadavosti.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, při teplotě nepřesahující 30 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název jednotlivých protimikrobních přísad.

Capsulae durae

Tvrdé tobolky

Obal tvrdých tobolek se skládá ze dvou předem vyrobených válcovitých částí, jejichž jeden konec je zakulacený a uzavřený, druhý je otevřený.

Výroba

Léčivá látka (látky) obvykle v tuhé formě (prášky nebo granuláty) je naplněna do jedné části obalu, který se uzavře nasazením víčkové části. Pevnost uzávěru může být zvýšena vhodnými prostředky.

Zkoušení

Rozpadavost. Tvrdé tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek *(2.9.1)*. Použije se *voda R* jako tekutina. Je-li předepsáno a schváleno, použije se místo vody *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS* nebo *žaludeční šťáva umělá R* jako tekuté prostředí. Jestliže tobolky plavou na hladině, lze přidat disky. Není-li předepsáno a schváleno jinak, přístroj pracuje 30 min a pak se hodnotí stav tobolek. Tobolky vyhovují zkoušce, jestliže se rozpadlo všech šest tobolek.

Capsulae molles
Měkké tobolky

Obal měkkých tobolek je silnější než u tvrdých tobolek. Obaly jsou tvořeny jednou částí a mají různé tvary.

Výroba

Měkké tobolky se obvykle formují, plní a uzavírají v jednom pracovním procesu, ale pro použití ex tempore může být obal vyroben předem. Léčivá látka může být součástí materiálu obalu.

Kapaliny mohou být uzavřeny přímo. Tuhé látky jsou obvykle rozpuštěny nebo dispergovány ve vhodné pomocné látce, takže tvoří roztok nebo disperzi pastovité konzistence.

Vzhledem k vlastnostem materiálů a kontaktních povrchů může docházet k částečné migraci složek z obsahu tobolky do obalu a naopak.

Zkoušení

Rozpadavost. Měkké tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek *(2.9.1)*. Použije se *voda R* jako tekutina. Je-li předepsáno a schváleno, použije se místo vody *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS* nebo *žaludeční šťáva umělá R* jako tekuté prostředí. Do trubic se přidají disky. Tekuté léčivé látky nacházející se v tobolkách mohou narušovat disk. Za těchto okolností, a je-li schváleno, se disk nepoužije. Není-li předepsáno a schváleno jinak, přístroj pracuje 30 min a pak se hodnotí stav tobolek. Jestliže se při zkoušce tobolky přilepily k diskům, zkoušku nelze hodnotit, opakuje se zkouška s dalšími šesti tobolkami bez použití disků. Tobolky vyhovují zkoušce, jestliže se rozpadlo všech šest tobolek.

Capsulae enterosolventes
Enterosolventní tobolky
Synonymum. Acidorezistentní tobolky

Je to zvláštní druh přípravků s řízeným uvolňováním. Odolávají působení žaludeční šťávy a uvolňují léčivou látku (látky) ve střevní šťávě. Připravují se z tvrdých nebo měkkých tobolek s enterosolventním obalem nebo naplněním tobolek zrněnými prášky nebo částicemi s enterosolventním obalem.

Výroba

Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (látek) z tobolek naplněných zrněnými prášky nebo částicemi s enterosolventním obalem.

Zkoušení

Rozpadavost. U tobolek s enterosolventním obalem se provádí zkouška rozpadavosti *(2.9.1)* v následujícím provedení. Jako tekutina se použije *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS*. Přístroj se nechá pracovat bez disků 2 h nebo předepsanou a schválenou dobu a hodnotí se stav tobolek. Doba rezistence vůči kyselému prostředí se mění podle složení zkoušených tobolek. Obvykle jsou to 2 h až 3 h, ale i při schválení odchylky není menší než 1 h. Žádná z tobolek nevykazuje známky rozpa-

du nebo trhliny dovolující únik obsahu. Kyselina se nahradí *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 6,8* a do každé trubice se přidá disk. Přístroj pracuje 60 min a hodnotí se stav tobolek. Jestliže se při zkoušce tobolky přilepily k diskům, zkoušku nelze hodnotit, opakuje se zkouška s dalšími šesti tobolkami bez disků. Tobolky vyhovují zkoušce, jestliže se rozpadlo všech šest tobolek.

Capsulae cum liberatione modificata

Tobolky s řízeným uvolňováním
Synonymum. Tobolky s modifikovanou liberací

Jsou to tvrdé nebo měkké tobolky, jejichž obsah nebo obal nebo obojí obsahují vybrané pomocné látky, anebo jsou vyrobeny zvláštním postupem umožňujícím modifikovat rychlost nebo místo uvolňování léčivé látky (látek).

Výroba

Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (látek).

Emplastra transcutanea

Transdermální náplasti

Jsou to flexibilní farmaceutické přípravky různých velikostí obsahující jednu nebo více léčivých látek. Jsou určeny k aplikaci na neporušenou pokožku. Z transdermální náplasti uvolněné léčivé látky se po přechodu kožní bariérou dostávají do systémového oběhu.

Transdermální náplasti se obvykle skládají z vnější krycí vrstvy, zásobníku (matrice) s léčivem (léčivy) a ochranné odstranitelné vrstvy, která se před podáním transdermální náplasti odstraní.

Krycí vrstva je nepropustná pro léčivou látku (látky) a obvykle i pro vodu a je nosičem i ochranou pro přípravek. Tato vrstva může mít stejný nebo větší rozměr než zásobník s léčivou látkou. Ve druhém případě je přesahující okraj krycí vrstvy potřen adhezivními látkami, které po přitlačení zajistí přilnutí náplasti ke kůži.

Zásobník obsahuje léčivou látku (látky) a pomocné látky, jako jsou stabilizátory, solubilizátory nebo látky upravující rychlost uvolňování a zvyšující transdermální absorpci léčivých látek. Může zde být jednovrstevná nebo vícevrstevná tuhá nebo polotuhá matrice. Složení a struktura matrice ovlivňují difuzi léčivé látky (látek) do kůže. Zásobník někdy rovněž obsahuje adhezivní látky, které po přitlačení zajistí přilnutí náplasti ke kůži. Přípravek může mít charakter polotuhé matrice, na jejíž jedné straně je membrána, která řídí uvolňování a difuzi léčivé látky (látek) ze zásobníku. Adhezivní látky v tomto případě mohou být naneseny na část membrány nebo celou membránu nebo pouze okolo okraje membrány na krycí vrstvě.

Po přiložení na suchou čistou a nenarušenou kůži transdermální náplast po jemném přitlačení dlaní nebo prsty pevně přilne ke kůži. Lze ji odloupnout bez většího poškození pokožky. Náplast nesmí kůži dráždit nebo alergizovat ani po opakovaných aplikacích.

Ochranná odstranitelná vrstva je tvořena obvykle plastickým nebo kovovým materiálem. Při odstraňování se neodtrhuje zásobník (matrice nebo rezervoár) nebo adhezivní vrstva z náplasti.

Transdermální náplasti se obvykle balí jednotlivě do uzavřených sáčků.

Výroba

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci se využívá vhodných prostředků k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, transdermální náplasti vyhovují zkoušce C na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem.

Disoluce. Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (látek), např. jedna ze zkoušek popsaných ve stati Zkouška disoluce pro transdermální přípravky *(2.9.4)*. Podle složení, rozměrů a tvaru náplasti se použije disková nebo průtoková metoda nebo metoda rotujícího válce.

Lze použít membránu z různých materiálů, např. z porézní celulosy nebo silikonů. Neobsahuje však látky, které by bránily její funkci (např. mastnotu). Před zkouškou je možné připravit membránu vhodným způsobem, např. uložením na 24 hodin do média použitého při zkoušce. Membrána se umístí na povrch náplasti v místě uvolňování tak, aby nevznikly vzduchové bubliny.

Podmínky a hodnocení zkoušky schvaluje oprávněná autorita.

Uchovávání

Při pokojové teplotě, není-li uvedeno jinak.

Označování

V označení, kde je to vhodné, se uvede celkové množství léčivé látky (látek) v náplasti, dávka uvolněná za jednotku času a velikost plochy, z níž se léčivá látka uvolňuje.

Extracta

Extrakty

Extrakty jsou koncentrované, tekuté, tuhé nebo polotuhé přípravky, obvykle připravované z usušených rostlinných nebo živočišných drog. U některých může být extrahovaná látka předem upravena, např. inaktivací enzymů, rozdrobněním nebo odtučněním.

Extrakty se připravují macerací, perkolací nebo jinými vhodnými validovanými metodami za použití lihu nebo jiného vhodného vyluhovadla. Po extrakci, je-li třeba, se odstraní nežádoucí látky.

Příprava

Perkolací. Je-li třeba, rozdrobní se výchozí droga na částice vhodné velikosti, důkladně se promíchá s částí předepsaného vyluhovadla a nechá se potřebnou dobu stát. Pak se převede do perkolátoru a perkoluje se pomalu tak, aby byl materiál vždy překryt vyluhovadlem. Zbytek drogy po extrakci se vylisuje a získaná tekutina se spojí s perkolátem.

Macerací. Není-li předepsáno jinak, rozdrobní se výchozí droga na částice vhodné velikosti, promíchá se důkladně s předepsaným vyluhovadlem a nechá se stát v uzavřené nádobě potřebnou dobu. Zbytek drogy po extrakci se oddělí od vyluhovadla, a je-li třeba, vylisuje se. V tomto případě se obě tekutiny spojí.

Úprava na žádanou konzistenci se provede vhodnými metodami, obvykle za sníženého tlaku a za teploty, při které je co nejmenší nebezpečí rozkladu účinných látek. Zbytek vyluhovadla v extraktu nepřekračuje předepsaný limit.

Standardizované extrakty se upraví na definovaný obsah látek použitím vhodných inertních látek nebo použitím jiného extraktu z téhož rostlinného nebo živočišného materiálu použitého při přípravě.

Extracta fluida

Extrakty tekuté

Jsou to tekuté přípravky, u nichž obvykle jeden hmotnostní nebo objemový díl extraktu odpovídá jednomu hmotnostnímu dílu použité suché drogy. Tyto přípravky jsou upraveny, je-li třeba tak, že vyhovují požadavkům na obsah vyluhovadla, na obsah účinných látek nebo na zbytek po odpaření.

Tekuté extrakty se připravují metodami výše popsanými jen za použití lihu vhodné koncentrace nebo vody nebo rozpuštěním polotuhých nebo suchých extraktů v jednom z těchto rozpouštědel, a je-li třeba, zfiltrují se. Při kterémkoli způsobu přípravy mají extrakty srovnatelné složení.

Stáním se může vytvořit slabý sediment, pokud se složení významně nezmění.

Tekuté extrakty mohou obsahovat vhodné protimikrobní přísady.

Zkoušení

Relativní hustota *(2.2.5)*. Tekuté extrakty vyhovují požadavkům předepsaným v příslušných článcích.

Obsah ethanolu *(2.9.10)*. U tekutých lihových extraktů se provádí stanovení obsahu ethanolu. Obsah ethanolu vyhovuje předepsaným požadavkům.

Methanol a 2-propanol *(2.9.11)*. Tekuté lihové extrakty neobsahují více než 0,05 % *(V/V)* methanolu a ne více než 0,05 % *(V/V)* 2-propanolu, není-li předepsáno jinak.

Zbytek po odpaření. Tekuté extrakty vyhovují požadavkům předepsaným v příslušných článcích. Do odpařovací misky s plochým dnem o průměru 50 mm a výšce asi 30 mm se rychle převede 2,00 g nebo 2,0 ml zkoušeného extraktu. Odpaří se do sucha na vodní lázni a suší se 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Nechá se vychladnout v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* a zváží se. Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech nebo v gramech na litr.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněny před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název rostlinné nebo živočišné drogy použité k přípravě,
- kde je to vhodné, zda byl použit čerstvý rostlinný nebo živočišný materiál,

- název vyluhovadla a koncentrace ethanolu v procentech *(V/V)* použitého k přípravě,
- kde je to vhodné, koncentrace ethanolu *(V/V)* v konečném extraktu,
- obsah účinných látek nebo poměr výchozí drogy ke konečnému extraktu,
- název a koncentrace každé použité protimikrobní přísady.

Extracta semisolida

Extrakty polotuhé

Synonyma. Extracta tenuia et spissa, extrakty řídké a husté

Tyto přípravky mají polotuhou konzistenci, přechodnou mezi tekutými a suchými extrakty. Získávají se postupným odpařováním vyluhovadla užitého při přípravě. Používá se výhradně líh vhodné koncentrace nebo voda. Zbytek po odpaření je obvykle nejméně 70 %. Mohou obsahovat vhodné protimikrobní přísady.

Zkoušení

Zbytek po odpaření. Kde je to vhodné, polotuhý extrakt vyhovuje požadavkům příslušného článku. Do odpařovací misky s plochým dnem o průměru 50 mm a výšce asi 30 mm se rychle odváží 2,00 g zkoušeného extraktu. Odpaří se do sucha na vodní lázni a suší se 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Nechá se vychladnout v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* a zváží se. Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněny před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název rostlinné nebo živočišné drogy použité k přípravě,
- kde je to vhodné, zda byl použit čerstvý rostlinný nebo živočišný materiál,
- název vyluhovadla a koncentrace ethanolu v procentech *(V/V)* použitého k přípravě,
- obsah účinných látek nebo poměr výchozí drogy ke konečnému extraktu,
- název a koncentrace každé přidané protimikrobní přísady.

Extracta sicca

Suché extrakty

Jsou to tuhé přípravky získané odpařením vyluhovadla použitého při přípravě. Sušina je obvykle nejméně 95 %. Mohou obsahovat vhodné inertní látky.

Standardizované suché extrakty jsou upraveny na předepsaný obsah účinných látek vhodnými inertními látkami nebo suchými extrakty z rostlinných nebo živočišných drog použitých při přípravě.

Kde je to vhodné, je v příslušných článcích uvedena zkouška na obsah zbytkových rozpouštědel.

Zkoušení

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Suché extrakty vyhovují požadavku předepsanému v příslušných článcích. Do odpařovací misky s plochým dnem o průměru asi 50 mm a výšce asi 30 mm se rychle odváží 0,50 g jemně práškovaného zkoušeného extraktu. Suší se 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* se zváží. Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněny před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název a množství použité inertní látky,
- název rostlinné nebo živočišné drogy použité k přípravě,
- kde je to vhodné, zda byl použit čerstvý rostlinný nebo živočišný materiál,
- název vyluhovadla a obsah ethanolu v procentech *(V/V)* použitého k přípravě,
- obsah účinných látek nebo poměr výchozí drogy ke konečnému suchému extraktu.

Granula

Zrněné prášky

Synonyma. Pulveres granulati, granule, zrnka, granuláty

Požadavky na zrněné prášky určené k přípravě perorálních roztoků nebo suspenzí jsou uvedeny v článku Liquida peroralia. Kde je předepsáno a schváleno jinak, nevztahují se požadavky tohoto článku na zrněné prášky pro veterinární použití.

Jsou to léčivé přípravky tvořené z pevných, suchých shluků částic prášků dostatečně odolných při mechanickém namáhání. Jsou určeny k vnitřnímu použití. Jsou polykány přímo nebo žvýkány nebo se před podáním rozpustí nebo rozmíchají ve vodě nebo jiné vhodné tekutině.

Zrněné prášky obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami nebo bez nich, a je-li potřebné, barviva povolená oprávněnou autoritou a chuťové a aromatické přísady.

Zrněné prášky jsou jednodávkové (dělené) nebo vícedávkové (nedělené) přípravky. Jednotlivá dávka u vícedávkového přípravku se podává pomocí odměrky či jiné pomůcky umožňující odměření předepsaného množství. Každá dávka jednodávkového zrněného prášku je v jednotlivém obalu, např. v sáčku, papírovém váčku nebo lahvičce.

Obaly pro zrněné prášky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů zrněných prášků:
- šumivé zrněné prášky,
- obalené zrněné prášky,
- enterosolventní zrněné prášky,
- zrněné prášky s řízeným uvolňováním.

Výroba

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci zrněných prášků se používá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost (*2.9.6*). Není-li předepsáno a schváleno jinak, jednodávkové zrněné prášky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám. Zkouška se nevyžaduje pro přípravky multivitaminové a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost (*2.9.5*). Jednodávkové zrněné prášky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené léčivé látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Obsahuje-li přípravek prchavé látky, uchovává se ve vzduchotěsných obalech.

Granula effervescentia

Šumivé zrněné prášky

Jsou to neobalené zrněné prášky obvykle obsahující kyseliny a uhličitany nebo hydrogenuhličitany, které za přítomnosti vody prudce reagují za vzniku oxidu uhličitého. Jsou určeny k rozpouštění nebo dispergaci ve vodě před podáním.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Jedna dávka šumivých zrněných prášků se přenese do nádoby s 200 ml *vody R* při teplotě 15 °C až 25 °C a sleduje se vznik bublinek. Když se zastaví uvolňování plynu od jednotlivých zrnek, zrněný prášek má být rozpadlý, a to buď rozpuštěný, nebo dispergovaný ve vodě. Zkouška se opakuje s pěti dalšími dávkami. Přípravek vyhovuje, když každá ze šesti zkoušených dávek se rozpadla do 5 min.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Granula obducta

Obalené zrněné prášky

Jsou to obvykle vícedávkové přípravky obsahující zrna obalená nebo potažená jednou nebo více vrstvami směsí různých pomocných látek.

Výroba

Látky používané k obalování se obvykle nanášejí ve formě roztoku nebo suspenze za podmínek umožňujících odpaření rozpouštědla.

Zkoušení

Disoluce. Použije se vhodná zkouška k prokázání vhodného uvolňování léčivé látky (látek), např. jedna ze zkoušek popsaných ve stati Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem (*2.9.3*).

Granula enterosolventia

Enterosolventní zrněné prášky
Synonymum. Acidorezistentní zrněné prášky

Jsou to přípravky s řízeným uvolňováním odolné vůči žaludeční šťávě a uvolňující léčivou látku (látky) ve střevní šťávě. Těchto vlastností je dosaženo obalením zrn acidorezistentním materiálem nebo jinými vhodnými prostředky.

Výroba

Požadované uvolňování léčivé látky (látek) nebo přísad se ověří vhodnou zkouškou.

Granula cum liberatione modificata

Zrněné prášky s řízeným uvolňováním
Synonymum. Zrněné prášky s modifikovanou liberací

Jsou tvořeny obalenými nebo neobalenými zrny připravenými pomocí vybraných pomocných látek nebo vybraných postupů použitých samostatně nebo v kombinaci tak, aby se dosáhla vhodná rychlost uvolňování nebo místo uvolňování léčivých látek.

Výroba

Požadované uvolňování léčivé látky (látek) nebo přísad se prokáže vhodnou zkouškou.

Immunosera ad usum humanum

Imunní séra pro humánní použití

Ustanovení tohoto článku jsou určena pro použití v souvislosti s články na imunní séra pro humánní použití. Tyto požadavky se nevztahují nutně na imunní séra, která nejsou předmětem těchto článků.

Jsou to purifikované přípravky obsahující imunoglobuliny získané ze séra imunizovaných zvířat. Imunoglobuliny mají schopnost specificky neutralizovat hadí jedy nebo toxiny vytvářené bakteriemi nebo se specificky navazovat na bakterie, viry nebo jiné antigeny.

Výroba

Imunní séra se získávají ze zdravých zvířat imunizovaných vstříknutím vhodných toxinů nebo toxoidů, hadích jedů, suspenzí mikroorganismů nebo jinými antigeny. V průběhu imunizace nesmějí být zvířata léčena penicilinem. Globuliny obsahující imunizující látky se mohou získat ze séra působením enzymů a frakcionovanou precipitací nebo jinými chemickými nebo fyzikálními metodami.

Může se přidat vhodná protimikrobní konzervační látka, která se přidává vždy, když se přípravky vydávají ve vícedávkových obalech. Konečné sterilní výrobky se asepticky plní do sterilních nádobek, které se potom uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace.

Přípravky se mohou lyofilizovat postupem, který sníží obsah vody v konečném výrobku na nejvýše 1,0 %.

Imunní séra připravená působením enzymů a frakcionovanou precipitací jsou nejstabilnější při pH 6. Metoda jejich přípravy je taková, aby přípravky s tímto pH po jednom roce uchovávání při 20 °C neztratily více než 5 % a při 37 °C nejvýše 20 % své účinnosti.

Výrobní metoda se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Vlastnosti

Imunní séra jsou téměř bezbarvé nebo velmi slabě žluté tekutiny bez zákalu a téměř bez pachu s výjimkou pachu přidané protimikrobní konzervační látky. Lyofilizované přípravky jsou bílé nebo světle žluté povlaky nebo prášky snadno rozpustné ve vodě na bezbarvé nebo světle žluté roztoky se stejnými vlastnostmi jako odpovídající tekuté přípravky.

Zkoušky na čistotu

Následující požadavky se vztahují na tekuté a rozpuštěné lyofilizované přípravky.

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 7,0.

Cizí bílkoviny. Při precipitačních zkouškách se specifickými antiséry se prokáže přítomnost pouze bílkoviny deklarovaného živočišného druhu.

Celkové bílkoviny. Nejvýše 170 g/l. Provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou *(2.5.9)* a výsledek se násobí faktorem 6,25.

Albuminy. Nejvýše stopy albuminu při elektroforetickém stanovení, pokud není v článku předepsáno jinak.

Fenol *(2.5.15)*. Pokud přípravky obsahují fenol, jeho koncentrace nepřesahuje 2,5 g/l.

Sterilita *(2.6.1)*. Vyhovují zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Provede se biologické stanovení účinnosti, jak je uvedeno v článku, a pokud je to vhodné, vyjádří se výsledek v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Uchovávání

Uchovávají se při teplotě (5 ± 3) °C. Tekutá imunní séra se chrání před mrazem.

Doba použitelnosti. Stanoví se z výsledku počátečního stanovení účinnosti a vztahuje se na přípravky uchovávané za předepsaných podmínek.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název přípravku,
- počet mezinárodních jednotek v mililitru, pokud je to vhodné,
- číslo šarže nebo jiný údaj,
- způsob podání,
- podmínky uchovávání,
- doba použitelnosti; jedině u nádobek 1 ml nebo menších, pokud jsou baleny jednotlivě, může být doba použitelnosti ze značení na nádobce vypuštěna za předpokladu, že je uvedena na vnějším obalu a na štítku vnějšího obalu je uvedeno, že nádobka musí být uchovávána ve vnějším obalu až do použití,
- zvířecí druh, z něhož byl přípravek vyroben,
- název a množství protimikrobní konzervační látky nebo jiné přidané látky,
- označení látky, jež by mohla vyvolat nežádoucí účinek, a jaké jsou kontraindikace přípravku.
- *pro lyofilizované přípravky:*
  - název nebo složení a objem přiloženého rozpouštědla,
  - pokyn k použití přípravku ihned po rozpuštění,
- jméno a adresa výrobce.

Immunosera ad usum veterinarium

Imunní séra pro veterinární použití

Ustanovení tohoto článku jsou určena pro použití v souvislosti s lékopisnými články na imunní séra pro veterinární použití. Tyto požadavky se nevztahují nutně na imunní séra, která nejsou předmětem těchto článků.

Jsou to přípravky obsahující imunoglobuliny, které mají schopnost specificky neutralizovat toxiny nebo se specificky vázat s antigeny použitými při jejich přípravě. Jsou buď nativní, nebo purifikované.

Výroba

Získávají se ze séra zdravých zvířat imunizovaných vstříknutím toxinů nebo toxoidů, hadích jedů, virů, suspenzí mikroorganismů nebo jinými vhodnými antigeny. Pokud se v průběhu imunizace použije penicilin, zvířata se vykrvácejí až za 8 dní po jeho posledním podání. Mohou se přidat vhodné protimikrobní konzervační látky, které se přidávají vždy, když se přípravek vydává ve vícedávkových obalech.

Pro purifikované přípravky: globuliny obsahující imunní látky se získávají z nativních imunních sér enzymatickým působením a frakcionovanou precipitací nebo jinými chemickými nebo fyzikálními metodami. Purifikované přípravky jsou nejstabilnější při pH 6.

Vlastnosti

Imunní séra jsou tekutiny různé barvy podle metody přípravy. Rozplňují se asepticky do sterilních nádob, které se pak uzavírají. Lyofilizované tvoří povlaky nebo prášky, jež se rozpouštějí ve vodě.

Zkoušky na čistotu

Následující požadavky se vztahují na tekuté přípravky a na rozpuštěné lyofilizované přípravky.

Hodnota pH *(2.2.3)*. Nativní přípravky 7,0 až 8,0; purifikované přípravky 6,0 až 7,0.

Cizí bílkoviny. Při precipitačních zkouškách se specifickými antiséry se prokážou výhradně jen bílkoviny toho živočišného druhu, který byl použit k přípravě.

Albuminy. Purifikované přípravky vyhovují zkoušce na albuminy. Pokud není v článku předepsáno jinak, obsahují purifikovaná imunní séra zkoušená elektroforézou nejvýše jen stopy albuminu.

Celkové bílkoviny. Nejvýše 170 g/l. Provede se stanovení dusíku mineralizací s kyselinou sírovou *(2.5.9)* a výsledek se násobí faktorem 6,25.

Fenol *(2.5.15)*. Pokud přípravky obsahují fenol, jeho koncentrace nepřesahuje 5 g/l.

Sterilita *(2.6.1)*. Zkoušené přípravky vyhovují zkoušce na sterilitu. Pokud objem tekutiny v nádobě přesahuje 100 ml, použije se pokud možno membránové filtrace a živné půdy se inkubují nejméně 14 dní. Když se nemůže použít metoda membránové filtrace, smí se použít metoda přímého očkování.

Pokud je objem tekutiny v nádobě 20 ml nebo více, očkuje se do každé živné půdy nejméně buď 10 % obsahu, nebo 5 ml, podle toho, co je méně. Vhodný počet zkoušených vzorků je 1 % z šarže, nejméně však 4 a nejvíce 10 vzorků (*2.6.1*).

Stanovení účinnosti

Provede se biologické stanovení účinnosti, jak je uvedeno v článku, a výsledek se vyjádří v mezinárodních jednotkách na mililitr, pokud tyto jednotky existují.

Uchovávání

Chráněny před světlem při teplotě (5 ± 3) °C. Tekuté přípravky se chrání před mrazem.

Doba použitelnosti. Stanoví se z výsledku počátečního stanovení účinnosti a vztahuje se na přípravky uchovávané za předepsaných podmínek.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název přípravku,
- "pro veterinární použití",
- počet mezinárodních jednotek v mililitru, pokud tyto jednotky existují,
- číslo šarže nebo jiný údaj,
- podmínky uchovávání,
- doba použitelnosti,
- zvířecí druh, jemuž je přípravek určen,
- jméno zvířecího druhu, z něhož byl přípravek vyroben,
- název a množství protimikrobní konzervační látky nebo jiné přidané látky,
- zda by některá látka mohla vyvolat nežádoucí účinek,
- jaké jsou kontraindikace.
- *pro lyofilizované přípravky:*
  - název nebo složení a objem přiloženého rozpouštědla,
  - pokyn k použití přípravku ihned po rozpuštění,
- doporučené dávky pro různé živočišné druhy,
- jméno a adresa výrobce.

Inhalanda

Inhalační přípravky

Jsou to tekuté nebo tuhé přípravky určené k podání ve formě par, aerosolů nebo prášků do dolních dýchacích cest k místnímu nebo celkovému účinku. Obsahují jednu nebo několik léčivých látek rozpuštěných nebo dispergovaných ve vhodném vehikulu.

Inhalační přípravky mohou, podle typu přípravku, obsahovat propelenty, rozpouštědla, protimikrobní přísady a solubilizátory nebo stabilizátory. Pomocné látky nemají nepříznivý účinek na funkci mukózy nebo cilií v dýchacích cestách.

Inhalační přípravky se dodávají ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech. Jsou-li v tlakovém balení, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmacetica in vasis cum pressu.*

Přípravky určené k podání ve formě aerosolů (disperze tuhých nebo kapalných částic v plynu) se aplikují podle typu přípravku jedním z těchto zařízení:
- rozprašovačem,
- dávkovacím tlakovým inhalátorem,
- inhalátorem pro suchý prášek.

Rozlišuje se několik druhů inhalačních přípravků:
- tekuté inhalační přípravky,
- kapaliny pro rozprašování,
- dávkované tlakové přípravky pro inhalaci,
- prášky k inhalaci.

Výroba

Při vývoji inhalačního přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení a kritéria pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku jsou popsány ve stati Účinnost protimikrobních látek *(5.1.3)*.

Kontrola velikosti inhalovaných aerosolových částic zajistí, aby se podstatná část částic dostala do dolních dýchacích cest. Frakce jemných částic inhalačních přípravků se stanoví vhodnou metodou pro aerodynamické stanovení jemných částic *(2.9.18)*.

Tlakové dávkovací inhalátory jsou zkoušeny na těsnost a kontaminaci cizími částicemi.

Zkoušení

Dávková stejnoměrnost. Zkouška se týká kontroly dávky podané pomocí aplikačního zařízení, tedy dávky podané nemocnému. Nicméně u práškových inhalátorů využívajících tobolek nebo jiných jednodávkových obalů přípravků pro inhalaci je nahrazena stejnoměrností dávky v těchto obalech. Ve všech případech je dávková jednotka počet jednotek nebo stříků zařízení nebo insuflací, uvedených v označení či v návodu, potřebných k zajištění doporučené dávky.

U inhalačních přípravků obsahujících více než jednu léčivou látku se provádí zkouška dávkové stejnoměrnosti pro každou léčivou látku.

Označování

V označení na obalu se uvede, kde je to vhodné:
- počet podnětů (stříků, insuflací) zařízení poskytujícího doporučenou dávku,
- názvy všech protimikrobních přísad.

Inhalanda liquida

Tekuté inhalační přípravky

Lze rozlišit tři druhy tekutých inhalačních přípravků:
- přípravky určené k vypařování,
- tekutiny k rozprašování,
- dávkované tlakové přípravky pro inhalaci.

Tekuté inhalační přípravky jsou roztoky nebo disperze.

Disperze jsou snadno homogenizovatelné protřepáním a jsou natolik stabilní, aby bylo umožněno podání správné dávky. Může se použít vhodných rozpouštědel nebo solubilizátorů.

Přípravky určené k vypařování jsou roztoky, disperze nebo tuhé přípravky. Obvykle se přidávají do horké vody a inhalují se jako pára.

Liquida aerodispersionem formantia

Kapaliny pro rozprašování

Jsou to přípravky určené k přeměně na aerosoly pomocí rozprašovačů; vodné roztoky, suspenze nebo emulze.

Kapaliny pro rozprašování v koncentrovaném stavu se před použitím ředí na předepsaný objem předepsanou kapalinou.

Ke zlepšení rozpustnosti léčivých látek lze použít vhodná rozpouštědla a solubilizátory.

U vodných tekutin není pH nižší než 3 a vyšší než 8,5.

Suspenze a emulze se snadno zhomogenizují protřepáním. Jsou natolik stabilní, že to umožní podat správnou dávku.

Vodné přípravky pro inhalaci se dodávají ve vícedávkových obalech. Pokud přípravek nemá přiměřené protimikrobní vlastnosti, mohou obsahovat vhodnou protimikrobní přísadu v odpovídající koncentraci.

Rozprašovače jsou zařízení přeměňující kapaliny na aerodisperze pomocí vysokého tlaku plynu, ultrazvukových vibrací nebo jinými metodami. Tato zařízení umožňují při vhodné rychlosti a vhodné velikosti částic jejich inhalaci a vpravení do dolních cest dýchacích.

Výroba

Aerodynamické stanovení jemných částic kapalin pro rozprašování přeměněných pomocí rozprašovačů na aerosoly lze provést pomocí vhodného přístroje a postupu *(2.9.18)*.

Inhalanda in vasis cum pressu doses emittentia

Dávkované tlakové přípravky pro inhalaci

Jsou to roztoky, suspenze nebo emulze dodávané ve speciálních nádobách (tlakovkách) opatřených dávkovacím ventilem. Tyto přípravky jsou udržovány pod tlakem vhodnými hnacími plyny nebo vhodnými směsmi zkapalněných propelentů, které mohou být současně rozpouštědly. Mohou se přidat vhodná rozpouštědla nebo solubilizátory.

Zkoušení

Dávková stejnoměrnost. Tlakové nádoby se obvykle používají v obrácené poloze. Pro nádoby, s nimiž se pracuje ve vzpřímené poloze, se použije srovnatelná zkouška využívající metod zajišťujících úplné zachycení dávky uvolněné z ventilu u vzpřímené tlakovky.

a) Stejnoměrnost podané dávky. Tato zkouška se provádí, je-li v označení uvedena podaná dávka.

Použije se zařízení schopné kvantitativně zachytit dávku uvolněnou z rozprašovače s aplikátorem.

Lze použít těchto zařízení a postupů:

Dělicí nálevka na 500 ml se umístí v horizontální poloze a otvor zavíracího kohoutu se uzavře smotkem vaty zvlhčené vhodným rozpouštědlem. Pomocí vhodné pumpy se vhání do nálevky proud vzduchu rychlostí 30 l/min. Kohout se uzavře a vnitřek dělicí nálevky se vystříká vhodným rozpouštědlem.

Po dobu 5 s se nádobka protřepává a jedna dávka se odstříkne do odpadu. Nejméně po 5 s se přípravek znovu protřepává 5 s a opět se odstříkne jedna dávka do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Zavírací kohout nálevky se otevře a po 2 s se vystříkne aerodisperze z obrácené nádobky s přípravkem stlačením ventilu na 1 s. Přípravek v nádobce se opět 5 s protřepává a celý postup se opakuje, až počet vystříknutí odpovídá požadované podané dávce (dávkové jednotce). Kohout dělicí nálevky se uzavře a celý obsah nálevky se opětovným vypláchnutím shromáždí ve vhodné nádobě. Pak se stanoví obsah léčivé látky v získaném objemu.

Postup se opakuje s dalšími devíti tlakovými nádobami.

Není-li předepsáno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, když nejméně devět z deseti výsledků je v rozmezí 75 % až 125 % průměrné hodnoty a všechny výsledky jsou v rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodnoty. Jestliže dva nebo více výsledků je mimo rozmezí 75 % až 125 %, opakuje se zkouška s dalšími dvaceti nádobami. Nejvýše tři z třiceti výsledků mohou být mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný výsledek není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrné hodoty.

b) Stejnoměrnost odměřené dávky. Je-li v označení uveden požadavek odměřené dávky, provede se tato zkouška (stanovuje se dávka odměřená pomocí dávkovacího ventilu, ale bez použití aplikátoru).

Lze použít následující zařízení a postup:

Od vybrané tlakové nádoby se oddělí aplikační zařízení a pomocí vhodného rozpouštědla se odstraní všechny nálepky a značky na nádobě. Suchá tlaková nádoba se spojí s aplikačním zařízením. 5 s se přípravek protřepává a jedna dávka se odstříkne do odpadu. Nejméně po 5 s čekání se přípravek znovu protřepává 5 s a opět se odstříkne jedna dávka do odpadu. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Tlaková nádoba se oddělí od aplikačního zařízení (uvnitř i zevně) a vhodným rozpouštědlem se očistí stoupací trubička dávkovacího ventilu a špice ventilu. Celý dávkovací ventil se osuší.

Do malé nádoby vhodné k třepání se umístí vhodný držák vyrobený z inertního materiálu (např. držák se třemi nohami a středovým vroubkováním a otvorem zužujícím se směrem dolů.) Nádoba s držákem se naplní vhodným rozpouštědlem do výšky nejméně 25 mm nad místem vystříknutí přípravku (horní otvor držáku).

Po dobu 5 s se třepe tlakovou nádobou s dávkovacím ventilem a po přiložení ventilu v převrácené poloze k otvoru ve středu držáku se vstříkne dávka přípravku do rozpouštědla. Postup se opakuje, až počet vystříknutí odpovídá požadované dávkové jednotce. Tlaková nádoba se oddělí od aplikačního zařízení a vhodným rozpouštědlem se omyje vnitřek stoupací trubičky dávkovacího ventilu a všechny vnější povrchy. Omývací tekutina se přidá k roztoku a stanoví se množství léčivé látky.

Postup se opakuje s dalšími devíti tlakovými nádobami. Není-li předepsáno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, když nejméně devět z deseti výsledků je v rozmezí 75 % až 125 % průměrné hodnoty a všechny jsou v rozmezí 65 % až 135 %. Jestliže dva nebo více výsledků je mimo rozmezí 75 % až 125 %, opakuje se zkouška s dalšími dvaceti nádobami. Nejvýše tři z třiceti výsledků mohou být mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný výsledek mimo rozmezí 65 % až 135 %.

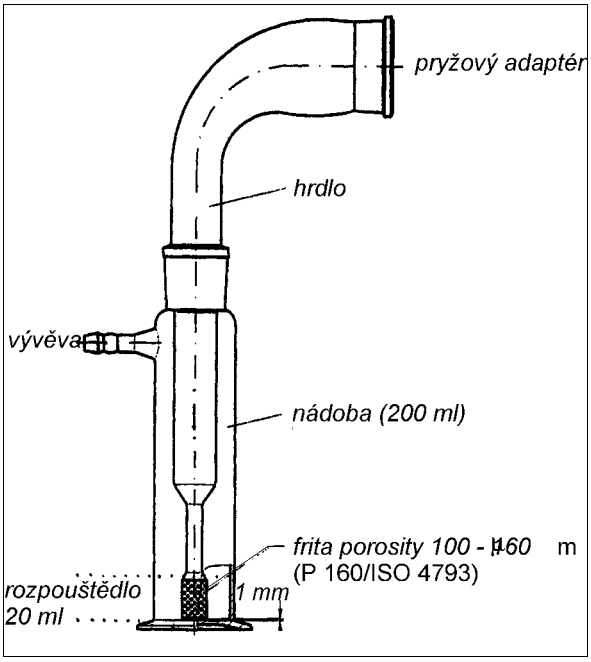
Aerodynamické stanovení jemných částic *(2.9.18)*. Zvolí se zkouška za použití vhodného přístroje.

Počet dávkových jednotek v nádobce. Tlaková nádoba s přípravkem se stisknutím ventilu vyprázdní do odpadu vždy nejméně po 5 s. Celkový počet takto zjištěných dávkových jednotek není menší, než je uvedeno v označení.

Pulveres ad inhalationem

Prášky k inhalaci

Jsou to přípravky ve formě jednodávkových dělených prášků, vícedávkových nedělených prášků nebo prášků získávaných z pevných výlisků. Pro usnadnění použití mohou být léčivé látky kombinovány s vhodným nosičem. Jsou podávány pomocí inhalátorů pro suché prášky. U jednodávkových prášků se inhalátor plní prášky z tobolek nebo z jiné vhodné lékové formy. U vícedávkových prášků dávku tvoří měrná jednotka v inhalátoru nebo soubor předem dělených prášků.



Obr. 1.

Zkoušení

Dávková stejnoměrnost.

a) Stejnoměrnost podané dávky. Tato zkouška se použije pro jednodávkové prášky, které mají v označení uvedenu podávanou dávku, a pro vícedávkové prášky.

Použije se zařízení schopné kvantitativně zachytit léčivou látku v dávce emitované z inhalátoru. Vhodné zařízení je naznačeno na obrázku 1. Použije se následující postup.

Připraví se inhalátor k použití pomocí vhodné pumpy a vypustí se dávka do odpadu. Postup se opakuje s dalšími čtyřmi dávkami. Inhalátor připravený k použití se spojí se sběrným zařízením pomocí těsnícího adaptéru. Po zapnutí pumpy se inhalátorem nechají projít 3 litry vzduchu vhodnou rychlostí, např. 60 l/min. Postup se opakuje tolikrát, dokud počet dílčích dávek neodpovídá dávkové jednotce shodné se zkoušeným vzorkem. Zařízení se rozebere, všechny vnitřní povrchy se opláchnou a množství léčivé látky se stanoví ve spojené promývací tekutině.

Postup se opakuje s dalšími devíti inhalátory.

Přípravek vyhovuje zkoušce, neliší-li se více než jeden výsledek z desíti od průměrné hodnoty o více než 35 % a žádná hodnota o více než 50 %. Liší-li se dvě nebo tři hodnoty o více než 35 % a žádná o více než 50 %, zkouší se dalších 20 inhalátorů. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se nejvýše tři ze třiceti výsledků odchýlí od průměru o více než 35 % a žádný výsledek o více než 50 % od průměrné hodnoty.

b) Stejnoměrnost předem dělené dávky. Je-li u přípravku uvedeno podávání pomocí předem dělených dávek z tobolek, blistrů ap., přípravek vyhovuje zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových přípravků *(2.9.6)*.

Aerodynamické stanovení jemných částic *(2.9.18)*. Zvolí se zkouška za použití vhodného přístroje.

Počet dávkových jednotek v nádobce. Dávky se vyprazdňují ze zařízení vhodnou tokovou rychlostí. Zaznamená se počet podání. Celkový počet dávkových jednotek není menší, než je uvedeno v označení na obalu.

Liquida ad usum dermicum

Tekutiny pro kožní aplikaci

Kde je předepsáno a schváleno, požadavky tohoto článku se nevztahují na tekutiny pro kožní aplikaci určené pro veterinární použití.

Jsou to tekuté přípravky různé viskozity určené k aplikaci na kůži (včetně vlasové části) nebo nehty k dosažení požadovaného místního účinku. Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze, které obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném rozpouštědle. Mohou obsahovat vhodné protimikrobní přísady, antioxidační látky anebo pomocné látky, jako jsou stabilizátory, emulgátory nebo látky zvyšující viskozitu.

V emulzích se mohou oddělovat fáze, které jsou snadno protřepáním znovu homogenizovatelné. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby bylo umožněno podání homogenního přípravku.

Pokud jsou tekutiny pro kožní aplikaci dodávány v tlakových nádobách, vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu.*

Přípravky určené k aplikaci na vážně poškozenou kůži jsou sterilní.

Rozlišuje se několik druhů tekutin pro kožní aplikaci: šampony, kožní pěny, omývadla nebo mazání.

Výroba

Při vývoji tekutiny pro kožní aplikaci obsahující protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek *(5.1.3)*.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tekutin pro kožní aplikaci se využívají vhodné způsoby zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.5*).

Sterilní tekutiny ke kožní aplikaci jsou vyráběny za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při výrobě tekutin pro kožní aplikaci obsahujících dispergované částice se využívají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Je-li přípravek sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení se uvede:
- název všech protimikrobních přísad,
- zda je přípravek sterilní.

Saponata medicinalia
Šampony

Jsou to tekuté přípravky určené k aplikaci na pokožku s vlasy a následnému opláchnutí vodou. Smíchané s vodou obvykle pění.

Šampony jsou emulze, suspenze, roztoky nebo polotuhé přípravky. Obsahují povrchově aktivní látky.

Spumae dermales
Kožní pěny

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Spumae medicatae*.

Liquida peroralia
Perorální tekutiny

Kde je předepsáno a schváleno, požadavky tohoto článku se nevztahují na perorální tekutiny pro veterinární použití.

Jsou to obvykle roztoky, emulze nebo suspenze obsahující jednu nebo více léčivých látek ve vhodném rozpouštědle; některé perorální tekutiny mohou být jen samotné kapalné léčivé látky.

Perorální tekutiny jsou určeny k polykání neředěné nebo po zředění. Tyto přípravky lze též připravit před podáním za použití vhodného rozpouštědla z koncentrovaných tekutých přípravků, prášků, granulí nebo tablet pro přípravu perorálních roztoků nebo suspenzí.

Perorální tekutiny mohou obsahovat vhodné protimikrobní přísady, antioxidanty a jiné pomocné látky, jako dispergační přísady, stabilizátory suspenzí, látky zvyšující viskozitu, emulgátory, tlumivé roztoky, smáčedla, solubilizátory, stabilizátory, korigencia, sladidla a barviva schválená oprávněnou autoritou.

V emulzích se mohou oddělovat fáze, které jsou snadno protřepáním znovu homogenizovatelné. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby bylo umožněno podání homogenního přípravku.

Perorální tekutiny jsou dodávány ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech. Jsou podávány objemově, např. 5 ml nebo násobky základního objemu nebo v malých objemech (kapky). Každá dávka vícedávkového přípravku je podána a odměřena pomocí vhodného přídavného zařízení.

Obaly pro perorální tekutiny, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Výroba

Při vývoji perorální tekutiny obsahující protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek *(5.1.3)*.

Při výrobě, balení, skladování a distribuci perorálních tekutin se využívají vhodné způsoby k zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Při výrobě perorálních tekutin obsahujících dispergované částice se využívají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost. Není-li předepsáno a schváleno jinak, jednodávkové tekuté přípravky ve formě suspenze vyhovují následující zkoušce. Po protřepání se každý obal co nejvíce vyprázdní a stanoví se jednotlivé obsahy. Přípravek vyhovuje zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem *(2.9.6)*.

Hmotnostní stejnoměrnost. Jednodávkové tekuté přípravky ve formě roztoku nebo emulze vyhovují následující zkoušce. Zváží se jednotlivě hmotnosti obsahu 20 obalů co nejvíce vyprázdněných a vypočte se průměrná hmotnost. Nejvíce dvě jednotlivé hmotnosti se odlišují od průměrné hmotnosti o více než 10 % a žádná se neliší o více než 20 %.

Dávka a dávková stejnoměrnost perorálních kapek. Do vhodného odměrného válce se pomocí kapacího zařízení odkape obvykle předepisovaný počet kapek pro jednu dávku nebo se do odměrného válce vpraví pomocí odměrky obvykle předpisovaná dávka. Rychlost kapání nepřesahuje dvě kapky/s. Tekutiny se zváží, dávkování se opakuje a opět zváží. Celý proces se opakuje, až se stanoví jednotlivé hmotnosti deseti dávek. Vypočte se průměrná hmotnost. Žádná z jednotlivých hmotností se neliší od průměrné hmotnosti o více než 10 %. Součet 10 jednotlivých hmotností se neliší o více než 15 % od deklarovené hmotnosti 10 dávek. Je-li třeba, odměří se objem 10 dávek. Tento objem se neliší o více než 15 % od deklarovaného objemu 10 dávek.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- jména všech protimikrobních přísad,
- u perorálních kapek, jejichž dávka je odměřována kapkami, údaj o počtu kapek na mililitr přípravku nebo gram přípravku.

Pulveres et granulata pro solutione aut suspensione perorali

Prášky a zrněné prášky pro perorální roztoky a suspenze
Synonymum. Prášky a granule pro perorální roztoky a suspenze

Jsou to přípravky pro perorální podání, které odpovídají definicím v článcích *Pulveres perorales* a *Granula*. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění dispergace nebo rozpuštění a k zabránění shlukování.

Po přípravě roztoku nebo suspenze tyto vyhovují požadavkům na perorální roztoky nebo perorální suspenze, kde je to vhodné.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, jednodávkové prášky a jednodávkové zrněné prášky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám. Zkouška se neprovádí u přípravků multivitaminových a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Jednodávkové prášky a jednodávkové zrněné prášky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené účinné látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- návod na přípravu roztoku nebo suspenze,
- podmínky a doba uchovávání připraveného roztoku nebo suspenze.

Nasalia

Nosní přípravky

Jsou to tekuté, polotuhé nebo tuhé přípravky určené k podání do nosní dutiny k dosažení systémového nebo místního účinku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek. Nosní přípravky jsou pokud možno nedráždivé a bez nepříznivého vlivu na funkce nosní mukosy a cilií. Vodné nosní přípravky jsou obvykle izotonické.

Nosní přípravky jsou dodávány ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech opatřených, pokud je to nutné, vhodným aplikačním zařízením zabezpečeným proti znečištění.

Pokud není předepsáno a schváleno jinak, vodné nosní přípravky dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobní přísady ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti.

Obaly pro nosní přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů nosních přípravků:
- nosní kapky a tekuté nosní spreje,
- zásypy do nosu,
- polotuhé nosní přípravky,
- nosní omývadla,
- nosní tyčinky.

Výroba

Při vývoji nosního přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek (*5.1.3*).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci nosních přípravků je vhodnými způsoby zajištěna jejich mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Sterilní nosní přípravky jsou vyráběny za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při výrobě nosních přípravků obsahujících dispergované částice se využívají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech. Je-li přípravek sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název všech protimikrobních přísad,
- zda je přípravek sterilní.

Rhinoguttae et praeparata liquida nasalia pro aerodispersione

Nosní kapky a tekuté nosní spreje

Jsou to roztoky, emulze nebo suspenze určené ke vkápnutí nebo vstříknutí do nosní dutiny. V emulzích se mohou oddělovat fáze, ale protřepáním se snadno znovu zhomogenizují. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Nosní kapky jsou obvykle dodávány ve vícedávkových nádobách opatřených vhodným aplikátorem. Tekuté nosní spreje jsou dodávány v nádobách s rozprašovacím zařízením nebo v tla-

kových nádobách s vhodným aplikátorem, popř. s dávkovacím ventilem, které vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu.*

Velikost částic spreje má být taková, aby jejich usazování bylo omezeno na nosní dutinu.

Zkoušení

Pokud není předepsáno a schváleno jinak, nosní kapky v jednodávkových obalech a dávkované nosní spreje pro celkový účinek vyhovují následujícím zkouškám.

Hmotnostní stejnoměrnost. Nosní kapky ve formě roztoku vyhovují následující zkoušce. Zváží se jednotlivě obsah deseti obalů vyprázdněných, jak lze nejvíce, a vypočte se průměrná hmotnost obsahu. Hmotnost nejvýše dvou obsahů se odlišuje o více než 10 % od průměrné hmotnosti a hmotnost žádného obsahu se neliší o více než 20 % od průměrné hmotnosti.

Dávkované nosní spreje ve formě roztoků vyhovují následující zkoušce. Odstříkne se jedna dávka, čeká se nejméně 5 s a odstříkne se další dávka. To se opakuje ještě třikrát. Zváží se hmotnost celé nádoby, odstříkne se jedna dávka a opět se zváží nádoba. Vypočítá se rozdíl těchto dvou hmotností. Postup se opakuje s dalšími devíti nádobami a vypočítá se průměrná hmotnost dávky. Hmotnost nejvýše dvou dávek se odlišuje o více než 25 % od průměrné hmotnosti dávky a hmotnost žádné dávky se neodlišuje o více než 35 % od průměrné hmotnosti dávky.

Obsahová stejnoměrnost. Nosní kapky ve formě suspenzí nebo emulzí vyhovují následující zkoušce. Stanoví se jednotlivé obsahy při důkladném vyprázdnění obalů. Obsahy vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost *(2.9.6)*.

Dávková stejnoměrnost. Dávkované nosní spreje, jež jsou suspenzemi nebo emulzemi, vyhovují následující zkoušce. Použije se sběrné zařízení schopné kvantitativně zachytit dávku z aplikačního zařízení. Nádobka se protřepává po dobu 5 s a jedna dávka se odstříkne do odpadu. Vyčká se nejméně 5 s, protřepává se opět 5 s a dávka se odstříkne. Tento postup se opakuje ještě třikrát. Po 2 s se vstříkne rozprašovacím zařízením jedna dávka nosního spreje do sběrného zařízení. Pomocí následných výplachů se získá celá dávka ze sběrného zařízení a stanoví se obsah léčivé látky v jedné dávce. Tento postup se opakuje u dalších 9 nádob.

Není-li předepsáno a schváleno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše jeden obsah jedné dávky je mimo rozmezí 75 % až 125 % průměrného obsahu a žádný obsah jedné dávky není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrného obsahu jedné dávky.

Jsou-li dva nebo tři jednotlivé obsahy mimo rozmezí 75 % až 125 %, avšak jsou v mezích 65 % až 135 %, opakuje se zkouška s dalšími 20 jednotlivými dávkami. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže nejvýše tři jednotlivé obsahy z celkových třiceti jsou mimo rozmezí 75 % až 125 % a žádný není mimo rozmezí 65 % až 135 % průměrného obsahu jedné dávky.

Pulveres nasales

Zásypy do nosu

Synonymum. Nosní prášky

Jsou určeny k insuflaci do nosní dutiny pomocí vhodného zařízení.

Zásypy do nosu vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Pulveres adspersorii.*

Velikost částic je taková, aby jejich usazování bylo omezeno na nosní dutinu, a velikost částic se ověřuje vhodnou metodou.

Praeparata nasalia semisolida
Polotuhé nosní přípravky

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Unguenta*.
Obaly jsou upraveny k podání přípravku na místo aplikace.

Lotiones nasales
Nosní omývadla

Jsou to obvykle vodné roztoky určené k čištění nosních dutin.
Přípravky pro aplikaci na poraněné části nebo před chirurgickým zákrokem jsou sterilní.

Styli nasales
Nosní tyčinky

Vyhovují požadavkům uvedeným v článku *Styli*.

Ocularia

Oční přípravky

Synonymum. Ophthalmica

Jsou to sterilní tekuté, polotuhé nebo tuhé přípravky určené k podání na oční bulvu a spojivku nebo k vložení do spojivkového vaku.

Obaly pro oční přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů očních přípravků:
- oční kapky,
- oční vody,
- polotuhé oční přípravky,
- oční inzerty.

Výroba

Při vývoji očního přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení ochranných vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek (*5.1.3*).

Oční přípravky se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při výrobě očních přípravků obsahujících dispergované částice se využívají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Oční přípravky vyhovují zkoušce na sterilitu. Odděleně dodávané aplikátory rovněž vyhovují zkoušce na sterilitu. Aplikátor se vyjme za aseptických podmínek z jeho obalu a přenese se do nádobky s živným roztokem tak, že se celý smočí. Inkubace a hodnocení jsou popsány ve zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

Není-li předepsáno jinak, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvedou názvy všech protimikrobních přísad.

Oculoguttae

Oční kapky

Jsou to sterilní vodné nebo olejové roztoky nebo suspenze obsahující jednu nebo více léčivých látek určené ke vkapávání do oka. Z důvodů nízké stability v konečném přípravku mohou být léčivé látky dodávány v suché sterilní formě, která se bezprostředně před podáním rozpustí nebo suspenduje v přidané sterilní tekutině.

Oční kapky mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě osmotického tlaku nebo viskozity, k úpravě nebo stabilizaci pH, zvýšení rozpustnosti účinných látek nebo ke stabilizaci přípravku. Tyto pomocné látky neovlivňují nepříznivě léčebný účinek přípravku a v použitých koncentracích nejsou příčinou přílišné místní dráždivosti.

Vodné oční přípravky dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobní přísady ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti. Použité protimikrobní přísady jsou kompatibilní se všemi dalšími složkami přípravku a jsou účinné po celou dobu použitelnosti očních kapek.

Jsou-li oční kapky předepsány bez protimikrobních přísad, dodávají se, kde je to vhodné, v jednodávkových obalech. Oční kapky určené k použití při chirurgických výkonech jsou bez protimikrobních přísad a jsou dodávány v jednodávkových obalech.

Oční kapky ve formě roztoku jsou při vizuální kontrole prakticky čiré a prakticky bez částic.

Oční kapky ve formě suspenze mohou vykazovat sediment, který je snadno roztřepatelný; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby umožňovala podání správné dávky.

Vícedávkové přípravky jsou dodávány v obalech umožňujících podání ve formě jednotlivých kapek. Pokud není předepsáno a schváleno jinak, lahvičky obsahují nejvýše 10 ml přípravku.

Zkoušení

Velikost částic. Oční kapky ve formě suspenze vyhovují následující zkoušce. Nanese se vhodné množství suspenze do měřicí cely nebo mikropipetou na podložní sklíčko a prohlédne se pod mikroskopem oblast odpovídající 10 µg tuhé fáze. Z praktických důvodů se doporučuje nejdříve prohlédnout celý vzorek při menším zvětšení (např. 50x) a nalézt částice větší než 25 µm. Tyto částice se pak změří při větším zvětšení (např. 200x až 500x). Nejvíce dvacet částic má největší průměr větší než 25 µm a nejvýše dvě z těchto částic mají největší průměr větší než 50 µm. Žádná částice nemá největší průměr větší než 90 µm.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- na vícedávkových obalech doba od prvního otevření, po níž se již přípravek nesmí používat. Tato doba nesmí být delší než 4 týdny, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Aquae ophthalmicae
Oční vody

Jsou to sterilní vodné roztoky určené k mytí nebo koupání očí nebo k napuštění očních obkladů.

Oční vody mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě osmotického tlaku nebo viskozity přípravku nebo k úpravě a stabilizaci pH. Tyto pomocné látky nemají nepříznivě ovlivňovat léčebný účinek přípravku nebo v používaných koncentracích být příčinou přílišné místní dráždivosti.

Oční vody dodávané ve vícedávkových obalech obsahují vhodné protimikrobní přísady ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti. Použité protimikrobní přísady jsou kompatibilní s dalšími složkami přípravku a jsou účinné po celou jeho dobu použitelnosti.

Jsou-li oční vody předepsány bez protimikrobních přísad, dodávají se v jednodávkových obalech. Oční vody určené k použití při chirurgických výkonech nebo k ošeření formou první pomoci jsou bez protimikrobních přísad a jsou dodávány v obalech určených k jednorázovému otevření v případě potřeby.

Oční vody vizuálně kontrolované jsou prakticky čiré a prakticky bez částic.

Nádoba pro vícedávkové přípravky neobsahuje více než 200 ml oční vody, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- u jednodávkových přípravků, že obsah je určen jen pro jeden případ potřeby,
- u vícedávkových přípravků doba od prvního otevření, po níž se již nesmí přípravek používat.

Tato doba nesmí být delší než 4 týdny, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Ocularia semisolida
Polotuhé oční přípravky

Jsou to sterilní oční masti, krémy nebo gely určené k aplikaci na spojivku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek rozpuštěných nebo dispergovaných ve vhodném základu. Mají homogenní vzhled.

Polotuhé oční přípravky vyhovují požadavkům článku *Unguenta.* Základ nemá dráždit spojivku.

Polotuhé oční přípravky jsou baleny v malých sterilizovaných stlačitelných tubách, uzavřených nebo doplněných aplikačním nástavcem. Obsah přípravku není větší než 5 g. Tuby jsou dobře uzavřeny k zabránění mikrobiální kontaminace. Polotuhé oční přípravky lze rovněž balit do vhodných jednodávkových obalů.

Zkoušení

Velikost částic. Polotuhé oční přípravky obsahující dispergované tuhé částice vyhovují následující zkoušce. Množství přípravku odpovídající nejméně 10 µg tuhé fáze se rozetře do tenké vrstvy a pod mikroskopem se pozoruje celá oblast vzorku. Z praktických důvodů se doporučuje nejdříve prohlédnout vzorek při menším zvětšení (např. 50x) a nalézt částice větší než 25 µm. Tyto částice se pak změří při větším zvětšení (např. 200x až 500x). Každých 10 µg tuhé účinné látky může mít nejvýše dvacet částic s největším průměrem přesahujícím 25 µm a nejvýše dvě z těchto částic smějí mít největší průměr větší než 50 µm. Žádná částice nesmí mít největší průměr větší než 90 µm.

Oculoinserta

Oční inzerty

Jsou to sterilní, tuhé nebo polotuhé přípravky vhodných rozměrů a tvaru určené k podání do spojivkového vaku a mající účinek na oko. Obecně jsou tvořeny zásobníkem účinné látky vsazeným do matrice nebo spojeným s membránou řídící rychlost uvolňování. Léčivá látka, která je více nebo méně rozpustná ve fyziologických tekutinách, se uvolňuje po stanovenou dobu.

Oční inzerty jsou dodávány jednotlivě ve sterilních obalech.

Výroba

Při výrobě očních inzertů jsou zajištěny vhodné disoluční parametry potřebnými prostředky.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Oční inzerty, kde je to vhodné, vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnoměrnost.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- kde je to vhodné, celkové množství účinné látky v inzertu,
- kde je to vhodné, uvolněná dávka za jednotku času.

Parenteralia

Parenterální přípravky

Požadavky tohoto článku se nevztahují nutně na přípravky vyrobené z lidské krve, imunologické přípravky, radiofarmaka nebo protetické implantáty. Zvláštní požadavky mohou mít veterinární přípravky, a to podle druhů zvířat, pro něž je přípravek určen.

Jsou to sterilní přípravky určené k podání do lidského nebo zvířecího těla injekcí, infuzí nebo implantací.

Parenterální přípravky vyžadují používání pomocných látek, např. k izotonizaci s krví, úpravě pH, zlepšení rozpustnosti, ke konzervaci léčiv nebo k zajištění vhodných protimikrobních vlastností, ale bez nepříznivého ovlivnění požadovaného léčebného účinku nebo v použité koncentraci bez toxicity a nevhodné místní dráždivosti.

Obaly pro parenterální přípravky jsou vyrobeny, pokud možno, z materiálů dostatečně transparentních, aby byla možná vizuální kontrola obsahu, s výjimkou obalů pro transplantáty a jiných předepsaných a schválených případů.

Obaly pro parenterální přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části). Parenterální přípravky jsou dodávány ve skleněných obalech *(3.2.1)* nebo jiných obalech, např. plastických *(3.2.2, 3.2.7, a 3.2.9)*, a v předem naplněných injekčních stříkačkách v souladu s požadavky oprávněné autority. Vzduchotěsnost obalů je zajištěna vhodným způsobem. Uzávěry jsou těsné, zabraňující kontaminaci mikroorganismy nebo jinými znečištěninami a dovolující obvykle odebrání části nebo celého obsahu bez odstranění uzávěru. Plastické materiály nebo elastomery *(3.2.9)* tvořící uzávěry jsou dostatečně tuhé a pružné, aby dovolily průnik jehly při co nejmenším odlučování částic. Uzávěry vícedávkových obalů jsou dostatečně pružné, aby zajistily uzavření vpichu po vytažení jehly.

Rozlišuje se několik druhů parenterálních přípravků:
- injekce,
- infuze,
- koncentráty pro injekce nebo infuze,
- prášky pro injekce nebo infuze,
- implantáty.

Výroba

Při vývoji parenterálního přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu se prokazuje účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek *(5.1.3)*.

Parenterální přípravky jsou vyráběny a připravovány za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Voda použitá k výrobě parenterálních přípravků vyhovuje požadavkům vody na injekci nerozplněné v článku *Aqua pro iniectione.*

Zkoušení

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Zkouška na bakteriální endotoxiny může nahradit zkoušku na pyrogenní látky v následujících případech:
- pro přípravek, který je předmětem článku lékopisu, může být zkouška předepsána v tomto článku,
- v jiných případech zkušební podmínky a požadavky jsou schvalovány oprávněnou autoritou,
- kde je předepsána a schválena zkouška na bakteriální endotoxiny, neprovádí se zkouška na pyrogenní látky, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Sterilita *(2.6.1)*. Vyhovují zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

Ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- jména a koncentrace všech protimikrobních přísad.

Iniectiones

Injekce

Synonymum. Injectabilia

Jsou to sterilní roztoky, emulze nebo suspenze. Připravují se rozpouštěním, emulgováním nebo suspendováním léčivé látky a všech dalších přidávaných látek ve vodě na injekci (*Aqua pro iniectione*), ve vhodné sterilní nevodné tekutině nebo ve směsi těchto vehikulí.

Injekční roztoky zkoušené za vhodných podmínek viditelnosti jsou čiré a prakticky prosté částic.

Injekční emulze nevykazují oddělování fází. Injekční suspenze mohou obsahovat sediment, který je snadno roztřepatelný; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby bylo umožněno odebrání správné dávky.

Jednodávkové přípravky. Skutečný objem injekční tekutiny v jednodávkovém obalu je dostatečný pro nasátí a podání jmenovité dávky běžnou technikou.

Vícedávkové přípravky. Vícedávkové vodné injekce obsahují vhodnou protimikrobní přísadu ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti. Je-li parenterální přípravek dodáván ve vícedávkovém obalu, jsou vyžadována opatření při jeho podávání a zvláště při uchovávání mezi jednotlivými odběry dávek.

Protimikrobní přísady. Vodné přípravky připravované za aseptických podmínek a ty, které nemohou být sterilizovány v ampulích, mohou obsahovat vhodnou protimikrobní přísadu ve vhodné koncentraci.

Protimikrobní přísada se nepřidává, jestliže:

- objem podávaný v jednotlivé dávce je vyšší než 15 ml, není-li uvedeno a schváleno jinak,
- přípravek je podáván cestami, kde z lékařských důvodů není protimikrobní přísada přijatelná, např. při aplikaci intracisternální nebo jinou cestou, při níž se injekce dostane do styku s mozkomíšním mokem, nebo při podání intra- a retrookulárním.

Tyto přípravky jsou dodávány v jednodávkových obalech.

Výroba

U injekcí, jež jsou emulzemi nebo suspenzemi, výrobce prokáže oprávněné autoritě, že velikost dispergovaných částic je vhodně kontrolována s ohledem na způsob použití přípravku.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, jednodávkové injekční suspenze s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají uvedeným podmínkám. Zkouška se nevyžaduje pro přípravky multivitaminové a se stopovými prvky.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Je-li podávaný objem jedné dávky větší než 15 ml a není-li předepsána a schválena zkouška na bakteriální endotoxiny, přípravek vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, pokud není předepsáno a schváleno jinak. Není-li předepsána a schválena zkouška na bakteriální endotoxiny, přípravek vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky i v případě, že objem jedné podávané dávky je menší než 15 ml a přípravek je označen jako prostý pyrogenních látek.

Infusiones

Infuze

Synonyma. Infundibilia, Infusiones intravenosae, intravenózní infuze

Jsou to sterilní vodné roztoky nebo emulze s vodou jako kontinuální fází. Jsou prosté pyrogenních látek a jsou obvykle izotonické s krví. Jsou určeny hlavně k podávání ve velkých objemech. Infuze neobsahují žádné protimikrobní přísady.

Infuzní roztoky zkoušené za vhodných podmínek viditelnosti jsou čiré a prakticky prosté částic.

Infuzní emulze nevykazují oddělování fází.

Výroba

U infuzí, jež jsou emulzemi, výrobce prokáže oprávněné autoritě, že velikost dispergovaných částic je vhodně kontrolována s ohledem na způsob užití přípravku.

Zkoušení

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Není-li předepsána a schválena zkouška na bakteriální endotoxiny, přípravek vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, není-li předepsáno a schváleno jinak. Není-li předepsáno a schváleno jinak, aplikuje se 10 ml tekutiny na kilogram hmotnosti králíka.

Concentrata pro iniectionibus aut infusionibus

Koncentrované roztoky pro injekce nebo infuze

Synonymum. Parenterální přípravky určené k ředění

Jsou to sterilní roztoky určené k ředění pro injekce nebo pro infuze. Před podáním se ředí předepsaným objemem předepsané kapaliny. Po zředění vyhovují požadavkům na injekce nebo infuze.

Zkoušení

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Není-li předepsána a schválena zkouška na bakteriální endotoxiny, po zředění na příslušný objem vyhovují zkoušce na pyrogenní látky předepsané pro injekce nebo infuze, podle typu přípravku.

Pulveres pro iniectionibus aut infusionibus

Prášky pro injekce nebo infuze

Synonyma. Pulveres parenterales, prášky pro parenterální použití

Jsou to tuhé sterilní látky dodávané v obalech, v nichž se po protřepání s předepsaným objemem předepsané sterilní tekutiny rychle vytvoří buď čiré a prakticky částic prosté roztoky, nebo homogenní suspenze. Po rozpuštění nebo dispergaci vyhovují požadavkům na injekce nebo infuze.

Parenterální lyofilizáty jsou považovány za prášky pro parenterální použití.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, prášky pro injekce nebo infuze s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti nebo s celkovou jednotkovou hmotností rovnou nebo menší než 40 mg vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají uvedeným podmínkám. Zkouška se nevyžaduje pro přípravky multivitaminové a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Prášky pro injekce nebo infuze vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny léčivé látky v přípravku, zkouška na hmotnostní stejnoměrnost se neprovádí.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Není-li předepsána a schválena zkouška na bakteriální endotoxiny, po rozpuštění nebo dispergaci v příslušném objemu tekutiny vyhovují zkoušce na pyrogenní látky předepsané pro injekce nebo infuze, podle typu přípravku.

Implantata

Implantáty

Jsou to sterilní tuhé přípravky o velikosti a tvaru vhodném pro parenterální implantaci umožňující protrahované (dlouhodobé) uvolňování léčivých látek. Jsou dodávány výhradně jednotlivě ve sterilních obalech.

Praeademixta ad alimenta medicata ad usum veterinarium

Premixy pro medikaci krmiva k veterinárnímu použití

Synonymum. Medikovaný krmný doplněk pro veterinární použití

Jsou to směsi jedné nebo více léčivých látek obvykle ve vhodném vehikulu připravované k usnadnění podávání léčivých látek zvířatům. Používají se výhradně k přípravě medikovaných krmiv prostým smícháním.

Premixy bývají v granulované nebo práškové formě. Jsou sypké, případné shluky se rozpadají při normální manipulaci. Velikost částic a jiné vlastnosti premixu jsou takové, že zajišťují rovnoměrné rozptýlení léčivé látky (látek) v podávaném krmivu.

Výroba

Není-li předepsáno a schváleno jinak, koncentrace léčivé směsi v podávaném krmivu je nejméně 0,5 %.

Zkoušení

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 15,0 %, není-li předepsáno a schváleno jinak. 3,000 g se suší 2 h v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- druh a kategorie zvířat, jimž je premix určen,
- návod na přípravu medikovaného krmiva z premixu,
- ochranná lhůta mezi ukončením podávání medikovaného krmiva a porážkou zvířat ke konzumaci lidmi.

Praeparata ad irrigationem

Přípravky pro výplachy

Jsou to sterilní vodné velkoobjemové přípravky určené pro výplachy tělních dutin, otevřených ran a povrchů, např. při chirurgických zákrocích.

Jsou připravovány rozpuštěním jedné nebo více léčivých látek, elektrolytů nebo osmoticky aktivních látek ve vodě, která vyhovuje požadavkům článku *Aqua pro iniectione*, nebo obsahují pouze vodu. V posledním jmenovaném případě se označují jako voda pro výplachy.

Roztoky pro výplachy jsou obvykle izotonické s krví a vyšetřovány za vhodných podmínek viditelnosti jsou čiré a prakticky prosté částic.

Přípravky pro výplachy jsou dodávány v jednodávkových obalech. Obaly a uzávěry vyhovují požadavkům na obaly pro parenterální přípravky *(3.2.1* a *3.2.2)*, ale výstupní otvor obalu je inkompatibilní se zařízením pro intravenózní podání, aby bylo vyloučeno toto podání roztoku pro výplachy.

Výroba

Přípravky pro výplachy jsou připravovány za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Vyhovují zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.13)*. Nejvýše 0,5 m.j. endotoxinu v mililitru.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Přípravky, u nichž nelze použít validovanou zkoušku na bakteriální endotoxiny, vyhovují zkoušce na pyrogenní látky, při níž se vstřikuje 10 ml roztoku na kilogram hmotnosti králíka, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- že přípravek není určen k injekčnímu podání,
- že přípravek je určen jen k jednorázovému použití a nepoužitá část přípravku se odstraní.

Praeparata homeopathica

Homeopatické přípravky

Připravují se z látek, produktů nebo přípravků nazývaných výchozí suroviny pro výrobu za použití homeopatických postupů. Označují se obvykle latinským názvem výchozí suroviny a stupněm zředění.

Suroviny

Suroviny pro výrobu homeopatických přípravků jsou rostlinného, chemického, minerálního nebo živočišného původu.

U surovin živočišného původu musí být prokázáno, že neobsahují patogenní agens. Suroviny rostlinného a živočišného původu mohou být použity v čerstvém nebo sušeném stavu. Kde je to vhodné, může být čerstvý materiál uchováván hluboce zmrazený.

V oprávněných a schválených případech může být k přepravním a skladovacím účelům čerstvý materiál uchováván v lihu 96% za podmínky, že celý materiál, včetně lihu 96%, se použije pro výrobu.

Suroviny vyhovují požadavkům lékopisných článků.

Vehikula

Jsou to pomocné látky použité k přípravě výchozích surovin pro výrobu nebo k potenciaci, např. čištěná voda, líh o vhodné koncentraci, glycerol a laktosa.

Vehikula vyhovují požadavkům článků lékopisu.

Výchozí suroviny pro výrobu

Jsou to látky, produkty nebo přípravky použité jako výchozí materiály pro výrobu homeopatických přípravků. Výchozími surovinami pro výrobu jsou obvykle: látky rostlinného nebo živočišného původu, matečné tinktury, glycerolové výluhy, suroviny chemického nebo minerálního původu, jednotlivé látky.

Matečné tinktury

Jsou to tekuté přípravky získávané rozpouštěním surovin rostlinného nebo živočišného původu ve vhodném vehikulu. Mohou se připravit také z rostlinných šťáv s přidáním nebo bez přidání vehikula. Matečná tinktura se označuje symboly "MT" nebo "Ø".

Glycerolové výluhy

Jsou to tekuté přípravky získávané ze surovin rostlinného nebo živočišného původu za použití glycerolu, směsi glycerolu a lihu vhodné koncentrace nebo směsi glycerolu a roztoku chloridu sodného vhodné koncentrace.

Potenciace

Zředění a triturace se získávají z výchozích surovin pro výrobu potenciací podle výrobních homeopatických postupů; pro tekuté přípravky to jsou postupná ředění a třepání, pro pevné přípravky to jsou postupné vhodné triturace.

Potenciační kroky jsou obvykle:
- 1 díl výchozí suroviny pro výrobu a 9 dílů vehikula; lze je označit jako "D" nebo "DH" nebo "X" (desetinásobné, decimální),
- 1 díl výchozí suroviny pro výrobu a 99 dílů vehikula; lze je označit jako "C" nebo "CH" (stonásobné, centezimální).

Počet potenciačních kroků určuje stupeň zředění. Např. symboly "D3" nebo "3 DH" nebo "3X" znamenají tři decimální kroky a symboly "C3" nebo "3 CH" nebo "C3" znamenají tři centezimální kroky.

Lékové formy

Léková forma homeopatického přípravku vyhovuje příslušnému článku lékové formy a všem příslušným zkouškám pro danou lékovou formu popsanou v lékopise.

Praeparata insulini iniectabilia

Injekční insulinové přípravky

Injekční insulinové přípravky vyhovují požadavkům pro injekce, které jsou uvedeny v článku Parenteralia.

Jsou to sterilní přípravky obsahující lidský insulin, viz článek *Insulinum humanum*, nebo obsahující hovězí nebo prasečí insulin, viz článek *Insulinum*, pokud není uvedeno jinak. Obsahují 90,0 % až 110,0 % deklarovaného množství insulinu. Jsou vyráběny ve formě roztoků, suspenzí nebo směsi roztoků a suspenzí.

Výroba

Způsoby výroby injekčních insulinových přípravků jsou zvoleny tak, aby tyto přípravky splňovaly požadavky na dávkování a trvání terapeutického účinku.

Následující postupy se provedou ve vhodném pořadí v závislosti na způsobu přípravy:
- přidání vhodných protimikrobních látek,
- přidání vhodné izotonizační přísady nebo přísad,
- přidání vhodné látky nebo látek k upravení pH na předepsanou hodnotu,
- určení pevnosti vazby insulin obsahující složky nebo složek, v případě potřeby při výrobě tak, aby přípravek obsahoval předepsaný počet mezinárodních jednotek v mililitru,
- sterilizace filtrací insulin obsahující složky nebo složek v případě, že postup je prováděn za aseptických podmínek a za použití materiálů, které byly sterilizovány vhodným způsobem.

V případě potřeby se přidávají vhodná aditiva a použijí se vhodné postupy k zajištění příslušné fyzikální formy insulin obsahující složky nebo složek. Konečný přípravek je asepticky plněn do sterilních obalů, které jsou uzavřené tak, aby nedošlo k mikrobiálnímu znečištění.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 6,9 až 7,8; měří se roztok nebo suspenze, pokud není v článku uvedeno jinak.

Insulin v supernatantu. Nejvýše 2,5 % celkového obsahu insulinu v přípravcích tvořených suspenzí, není-li uvedeno jinak. Odstřeďuje se 10 ml suspenze při 1500 g_n po dobu 10 min a oddělí se

supernatantní tekutina od zbytku. Obsah insulinu v supernatantní tekutině *(S)* se stanoví vhodnou metodou. Obsah insulinu v procentech se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{100S}{T},$$

v němž značí:
T - celkový obsah insulinu zjištěný ve zkoušce Stanovení obsahu.

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Použije se roztok připravený pro zkoušku Stanovení obsahu.
Porovnávací roztok (a). Použije se porovnávací roztok připravený pro zkoušku Stanovení obsahu nebo porovnávací roztok (b) připravený pro zkoušku Stanovení obsahu, podle potřeby.
Porovnávací roztok (b). Použije se porovnávací roztok (c) připravený pro zkoušku Stanovení obsahu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm),
- mobilních fází s průtokovou rychlostí 1 ml/min tvořených následujícími roztoky připravenými a uchovávanými při teplotě nižší než 20 °C:
  - *mobilní fáze A* - 28,4 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml. Přidá se 2,7 ml *kyseliny fosforečné R*, a je-li třeba, upraví se pH na hodnotu 2,3 *ethanolaminem R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *heliem pro chromatografii R*,
  - *mobilní fáze B* - smíchá se 500 ml mobilní fáze A s 500 ml *acetonitrilu R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *heliem pro chromatografii R*,

Čas (min)	Mobilní fáze A % *(V/V)*	Mobilní fáze B % *(V/V)*	Poznámka
0 - 30	48	52	izokraticky
30 - 44	48 → 20	52 → 80	lineární gradient
44 - 50	20	80	izokraticky

- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (b) a zaznamená se chromatogram. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími lidskému insulinu a prasečímu insulinu je nejméně 1,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou eluovány dva hlavní píky v pořadí lidský insulin, prasečí insulin a případné malé píky následující bezprostředně za každým z obou hlavních píků odpovídajících příslušným monodeamidoderivátům.

Nastříkne se odděleně 20 µl zkoušeného roztoku a 20 µl porovnávacího roztoku (a). Je-li třeba, provede se dodatečná úprava mobilní fáze tak, aby protimikrobní konzervační látky přítomné ve zkoušeném roztoku byly dobře oddělené od insulinu a vykazovaly kratší retenční čas. Malé snížení koncentrace acetonitrilu zvýší retenční čas píků insulinu relativně více než konzervačních látek.

Nastříkne se 20 µl porovnávacího roztoku (a) a 20 µl zkoušeného roztoku. Na chromatogramu porovnávacího roztoku se objeví deamidoinsulin jako malý pík za hlavním píkem a jeho relativní retenční čas vzhledem k hlavnímu píku je asi 1,3. Na chromatogramu zkoušeného roztoku plocha píku odpovídajícího deamidoinsulinu není větší než 5,0 % celkové plochy všech píků, kromě píků odpovídajících konzervačním látkám. Součet ploch žádných dalších píků, kromě píku insulinu, píku

deamidoinsulinu a píku konzervačních látek, není větší než 3,0 % celkové plochy píků, kromě píků odpovídajících konzervačním látkám.

Celkový zinek. Nejvýše množství uvedené v jednotlivých článcích; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I). Použije se následující postup, pokud není v jednotlivých článcích uvedeno jinak.*

Zkoušený roztok. Objem zkoušeného přípravku obsahující 200 m.j. se opatrně protřepáním zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 25,0 ml. Je-li třeba, zředí se *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na koncentraci např. 0,4 μg až 1,6 μg Zn/ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se roztoky obsahující 0,40 μg, 0,80 μg, 1,00 μg, 1,20 μg, 1,60 μg Zn/ml za použití čerstvě připraveného základního *roztoku zinku (5 mg/ml Zn)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS.*

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového plamene vhodného složení (např. 2 l acetylenu a 11 l vzduchu/min).

Zinek v roztoku. Nejvýše množství uvedené v jednotlivých článcích. Stanoví se atomovou absorpční spektrofotometrií *(2.2.23, Metoda I).*

Zkoušený roztok. 1 ml čiré supernatantní tekutiny získané odstřeďováním zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* na 25,0 ml. Je-li třeba, zředí se na koncentraci např. 0,4 μg až 1,6 μg Zn/ml.
Porovnávací roztoky. Připraví se roztoky obsahující 0,40 μg, 0,80 μg, 1,00 μg, 1,20 μg, 1,60 μg Zn/ml za použití čerstvě připraveného základního *roztoku zinku (5 mg Zn/ml)* zředěním *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS.*

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového plamene vhodného složení (např. 2 l acetylenu a 11 l vzduchu/min).

Stanovení obsahu

Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29).*

Zkoušený roztok. 4 μl *kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l RS* se přidají k 1 ml zkoušeného přípravku, roztoku nebo suspenze, aby byl získán čirý okyselený insulinový roztok.
Porovnávací roztok (a). Pro přípravek obsahující jeden druh insulinu se rozpustí obsah lahvičky *lidského insulinu CRL* nebo *prasečího insulinu CRL* nebo definované množství *hovězího insulinu CRL* v *kyselině chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a zředí se jí tak, aby výsledný roztok obsahoval 4,0 mg/ml. Pro přípravek obsahující hovězí insulin a prasečí insulin se smíchá 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg/ml *hovězího insulinu CRL* a 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg/ml *prasečího insulinu CRL. Porovnávací roztok (a) se použije pro stanovení obsahu insulinu v přípravcích obsahujících 100 m.j./ml.*
Porovnávací roztok (b). 4,0 ml porovnávacího roztoku (a) se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 0,01 mol/l RS* na 10 ml. *Porovnávací roztok (b) se použije pro stanovení obsahu insulinu v přípravcích obsahujících 40 m.j./ml.*
Porovnávací roztok (c). 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg *lidského insulinu CRL* v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* a 1,0 ml roztoku obsahujícího 4,0 mg *prasečího insulinu CRL* v 1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,01 mol/l RS* se smíchají.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- ocelové nerezové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilních fází s průtokovou rychlostí 1 ml/min, kterými jsou následující roztoky připravené a uchovávané při teplotě nižší než 20 °C:

- *mobilní fáze A* - 28,4 g *síranu sodného bezvodého R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 1000 ml. Přidá se 2,7 ml *kyseliny fosforečné R*, a je-li třeba, upraví se pH na hodnotu 2,3 *ethanolaminem R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *heliem pro chromatografii R,*
- *mobilní fáze B* - smíchá se 500 ml mobilní fáze A s 500 ml *acetonitrilu R*. Zfiltruje se a roztok se odvzdušní probubláváním *heliem pro chromatografii R*,
- spektrofotometrického detektoru, 214 nm.

Teplota kolony se udržuje na 40 °C.

Zaznamenají se chromatogramy mobilní fáze obsahující 48 objemových dílů mobilní fáze A a 52 objemových dílů mobilní fáze B. V případě potřeby se upraví složení mobilní fáze.

Nastříkne se 10 µl porovnávacího roztoku (c) a zaznamená se chromatogram. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi píky odpovídajícími lidskému insulinu a prasečímu insulinu je nejméně 1,2. Je-li třeba, upraví se koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi tak, aby bylo dosaženo požadovaného rozlišení. Na chromatogramu porovnávacího roztoku (c) jsou eluovány dva hlavní píky v pořadí lidský insulin, prasečí insulin a případné malé píky následující bezprostředně za každým z obou hlavních píků odpovídající příslušným monodeamidoderivátům.

Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (a) pro přípravky obsahující 100 m.j./ml nebo 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku (b) pro přípravky obsahující 40 m.j./ml. Je-li třeba, upraví se mobilní fáze tak, aby se protimikrobní konzervační látky dobře oddělily od insulinu a měly kratší retenční čas. Malé snížení koncentrace acetonitrilu zvýší retenční čas píku insulinu relativně více než retenční čas konzervačních látek. Je-li třeba, promývá se kolona směsí stejných objemových dílů *acetonitrilu R* a *vody R* dostatečně dlouhou dobu, aby byly eluovány rušící příměsi před nástřikem dalších roztoků.

Vypočítá se obsah insulinu za použití plochy píku odpovídajícího hovězímu, prasečímu nebo lidskému insulinu a plochy píku odpovídajícího deamidoinsulinu a deklarovaného obsahu insulinu v *hovězím insulinu CRL, prasečím insulinu CRL* nebo *lidském insulinu CRL*, jak je potřeba. U přípravků obsahujících hovězí insulin a prasečí insulin se použije součet ploch píků odpovídajících hovězímu insulinu a prasečímu insulinu a píku odpovídajícího deamidoderivátu insulinu.

100 m.j. odpovídá 3,5 mg peptidu insulinu a 40 m.j. odpovídá 1,4 mg peptidu insulinu.

Uchovávání

Pokud není předepsáno jinak, uchovává se ve vzduchotěsných sterilních zabezpečených obalech, chráněn před světlem, při 2 °C až 8 °C. Insulinové přípravky nesmí zmrznout.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost mezinárodního standardu v m.j. na mililitr,
- obsah insulinu v miligramech na mililitr. U přípravků obsahujících hovězí insulin a prasečí insulin se uvede jejich součet,
- zda byla výchozí látka vyrobena enzymatickou přeměnou prasečího insulinu,
- zda byla výchozí látka vyrobena rDNK technologií,
- v případě potřeby původ zvířete,
- že přípravek se musí chránit před mrazem,
- v případě potřeby, že se přípravek před podáním musí protřepat.

Praeparata intramammariae ad usum veterinarium

Intramamární přípravky pro veterinární použití

Jsou to sterilní přípravky určené k zavedení do mléčné žlázy strukovými kanálky. Dělí se na dva hlavní druhy:
- přípravky k léčbě a prevenci infekcí zvířat v laktaci,
- přípravky k léčbě a prevenci infekcí zvířat na konci laktace nebo mimo laktaci (při zaprahování nebo při stání na sucho).

Intramamární přípravky pro veterinární použití jsou roztoky, emulze, suspenze nebo polotuhé přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek ve vhodném vehikulu. Mohou obsahovat pomocné látky, jako jsou stabilizátory, emulgátory, látky napomáhající tvorbě suspenze a zvyšující viskozitu. Suspenze mohou obsahovat sediment, který lze snadno roztřepat. V emulzích se mohou oddělovat fáze, dají se však snadno protřepáním znovu homogenizovat.

Pokud není předepsáno a schváleno jinak, jsou intramamární přípravky pro veterinární použití plněny do jednodávkových obalů upravených k zavedení do jednoho strukového kanálku zvířete. Jsou-li dodávány ve vícedávkových obalech, vodné přípravky obsahují vhodnou protimikrobní přísadu ve vhodné koncentraci, kromě případu, kdy samotný přípravek má přiměřené protimikrobní vlastnosti. Pro podávání a pro uchovávání přípravku mezi aplikacemi musí být stanovena bezpečnostní opatření.

Obaly pro intramamární přípravky k veterinárnímu použití, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Výroba

Při vývoji intramamárního přípravku pro veterinární použití obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek *(5.1.3)*.

Intramamární přípravky pro veterinární použití jsou vyráběny za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při výrobě intramamárních přípravků pro veterinární použití obsahujících dispergované částice se využívají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Využitelná hmotnost nebo objem. Podle pokynů v návodu se z deseti obalů vytlačí co nejvíce obsah. Průměrná hmotnost nebo objem se neliší o více než 10 % od deklarované hmotnosti nebo objemu.

Sterilita *(2.6.1)*. Intramamární přípravky pro veterinární použití vyhovují zkoušce na sterilitu. Použije se metoda membránové filtrace nebo, je-li předepsáno a schváleno, přímé očkování živné půdy. Obsah deseti obalů se vytlačí a pečlivě smíchá. Pro každou živnou půdu se použije 0,5 g až 1,0 g (nebo 0,5 ml až 1,0 ml) homogenizovaného vzorku.

Uchovávání

Ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název léčivé látky (látek) a její hmotnost nebo počet mezinárodních jednotek, které lze normálním způsobem z obalu získat a využít,
- údaj, zda je přípravek určen pro použití u zvířat v laktaci nebo u zvířat mimo laktaci,
- v případě vícedávkových obalů jména všech protimikrobních přísad.

Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu

Léčivé přípravky v tlakovém obalu

Synonymum. Léčivé spreje

Doplňující požadavky na přípravky v tlakovém obalu lze nalézt, podle typů, v dalších obecných článcích, např. Inhalanda, Liquida ad usum dermicum, Pulveres adspersorii, Nasalia a Auricularia.

Jsou dodávány ve speciálních nádobách pod tlakem plynu a obsahují jednu nebo více léčivých látek. Přípravky se uvolňují z nádoby vhodným ventilem ve formě aerosolu (disperze tuhých nebo kapalných částic v plynu, přičemž velikost těchto částic je přizpůsobena zamýšlenému použití) nebo jako tekutý nebo polotuhý proud, např. pěna. Potřebný tlak se vytváří vhodnými hnacími plyny (propelenty). Přípravky jsou tvořeny roztokem, emulzí nebo suspenzí a jsou určeny k místnímu podání na kůži nebo mukózní membrány tělních dutin nebo k inhalaci. Jako vhodné pomocné látky se používají např. rozpouštědla, solubilizátory, emulgátory, suspenzní činidla a mazadla pro ventily jako prevence proti ucpání.

Propelenty. Jsou buď tlakem zkapalněné nebo stlačené plyny, nebo kapaliny s nízkou teplotou varu. Zkapalněné plyny jsou např. halogenované uhlovodíky (zvláště fluoroderiváty) a uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotnostní (např. propan a butan). Stlačené plyny jsou např. oxid uhličitý, dusík a oxid dusný.

Aby se dosáhlo optimálních vlastností roztoku a požadovaného tlaku, dávkování a sprejových charakteristik, lze použít směsí propelentů.

Obaly. Používají se nádoby těsné a odolné vůči vnitřnímu přetlaku a vyrobené z materiálů kompatibilních s jejich obsahem. Materiály jsou kov, sklo, plasty nebo jejich kombinace. Skleněné nádoby jsou chráněny plastickým obalem.

Rozprašovací zařízení. Ventil, pokud se nepoužívá, udržuje nádobu dobře uzavřenou, při použití reguluje dávkování obsahu. Sprejové charakteristiky jsou dány typem rozprašovacího zařízení, zvláště rozměry, počtem a umístěním výstupních otvorů. Některé ventily umožňují kontinuální podávání, jiné (dávkovací ventily) uvolňují definované množství přípravku při každém stisknutí tlačítka rozprašovače.

Různé materiály ventilu, které jsou ve styku s obsahem nádobky, jsou s ním kompatibilní.

Požadavky na léčivé přípravky v tlakových obalech

Tyto přípravky jsou opatřeny aplikačním zařízením vhodným pro zamýšlené podání.

Zvláštní požadavky lze mít na výběr propelentů, velikost částic a jednotlivou dávku uvolněnou dávkovacími ventily.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- návod k použití,
- všechna bezpečnostní upozornění,
- u nádoby s dávkovacím ventilem množství léčivé látky v jednom vystříknutí.

Producta ab ADN recombinante

Přípravky vyrobené rekombinantní DNK technologií

Údaje v tomto článku jsou určené pro jednotlivé články v lékopise pojednávající o přípravcích vyrobených rekombinantní DNK technologií (rDNK). Kromě těchto článků není nutné uvedené požadavky dodržovat. Tento článek také není možno aplikovat na modifikované živé organismy používané přímo u lidí a zvířat, např. jako živé vakcíny.

Produkty technologie rDNK vznikají genetickou modifikací, při níž je DNK obsahující kódy pro požadovaný produkt vložena pomocí plazmidů nebo virů jako vektoru do vhodného mikroorganismu nebo buněčné linie, kde nastává exprese DNK a tvorba bílkoviny. Žádaná látka se pak získá extrakcí a čištěním. Buňka nebo mikroorganismus před vložením vektoru je nazývána hostitelskou buňkou a její stabilní spojení s vektorem, používané ve výrobním procesu, se nazývá hostitelsko-vektorový systém.

Výroba

Výroba je založena na validovaném systému jednotné inokulace užívajícím hostitelsko-vektorovou kombinaci, která splňuje požadavky oprávněné autority. Systém jednotné inokulace používá banku základních buněk a banku pracovních buněk, jež se odvozují od základního hostitelsko-vektorového systému. Dále se mají podrobně popsat postupy kultivace, extrakce a čištění a zavést definice výrobní šarže.

Důkaz vhodnosti spojení hostitele s vektorem a validace systému jednotné inokulace zahrnuje následující prvky.

Klonování a exprese

Vhodnost hostitelsko-vektorového systému, zvláště z hlediska mikrobiologické čistoty, se prokáže:
- *charakteristikou hostitelské buňky, včetně zdroje, fenotypu a genotypu a média buněčné kultury,*
- *dokumentací o strategii klonování genu a charakteristice rekombinantního vektoru, která zahrnuje:*

a) původ a charakteristiku genu,
b) sekvenční analýzu nukleotidů klonovaného genu a kontrolu styčných oblastí vektoru exprese. Klonované sekvence se omezí na minimum a všechny důležité exprimované sekvence se jasně identifikují a ověří na úrovni RNK.

   Sekvence DNK klonovaného genu se běžně ověří na úrovni výchozí kultury až po a případně i nad normální hranici populačního dvojnásobku pro celou stupnici fermentace. V některých systémech, kde např. je mnoho kopií genu vloženo do genomu kontinuální buněčné linie, není vhodné provádět sekvenci klonovaného genu na úrovni výroby. V těchto případech může pomoci "Southern blot" analýza celkové buněčné DNK nebo sekvenční analýza mediátorové RNK (mRNK). Zvláště je nutné věnovat pozornost charakterizaci exprimované bílkoviny,

c) konstrukci, genetiku a strukturu úplného vektoru exprese.
- *charakteristikou hostitelsko-vektorového systému, která zahrnuje:*
a) mechanismus přenosu vektoru do hostitelské buňky,
b) množství kopií, fyzikální stav a stabilitu vektoru uvnitř hostitelské buňky,
c) opatření použitá pro podporu a kontrolu exprese.

Systém buněčné banky

Banka základních buněk je homogenní suspenze původních buněk již změněných vektorem exprese, který obsahuje požadovaný gen. Pro skladování (např. v tekutém dusíku) je rozdělena ve stejných objemech do jednotlivých nádob. V některých případech je nutné vytvořit oddělené základní buněčné banky pro vektor exprese a hostitelské buňky.

Banka pracovních buněk je homogenní suspenze buněčného materiálu odvozeného z banky základních buněk na úrovni konečné pasáže. Pro skladování (např. v tekutém dusíku) je rozdělená ve stejných objemech do jednotlivých nádob.

Pro obě buněčné banky platí, že všechny nádoby jsou uchovávány stejným způsobem, a jestliže se jednou vyjmou z buněčného skladu, nesmí se tam znovu vrátit.

Buněčná banka může být použita pro výrobu na úrovni konečné pasáže nebo pro výrobu s kontinuální kultivací.

Výroba na úrovni konečné pasáže. Tato kultivační metoda je definována limitujícím počtem pasáží nebo zdvojením populace, které nesmí být při výrobě překročeno. Maximální počet zdvojení buněk nebo úrovní pasáží při rutinním procesu výroby splňuje níže popsaná kritéria.

Výroba s kontinuální kultivací. U této kultivační metody není omezen počet pasáží nebo zdvojení populace uskutečněných od počátku výroby. Kritéria pro výtěžek, jakož i pro ukončení výroby jsou definována výrobcem. Kulturu je nutné během jejího života monitorovat. Požadovaná frekvence a typ monitorování závisí na povaze výrobního systému a výrobku.

Nutné jsou též informace o molekulární neporušenosti exprimovaného genu a o fenotypové a genotypové charakteristice hostitelské buňky po dlouhodobé kultivaci. Souhlas s výtěžky pro další postup je jasně spojen se schématem požadovaného monitorování. Další postup výroby je také podmíněn jednoznačnou definicí šarže výrobku.

Validace buněčných bank

Validace buněčných bank obsahuje následující údaje:
a) o stabilitě buňky získané měřením životaschopnosti a schopnosti udržení vektoru,
b) o identitě buněk podle fenotypových vlastností,
c) někdy je nutný důkaz o nepřítomnosti zdrojů potenciálně onkogenních nebo náhodně infekčních činitelů (viry, bakterie, houby nebo mykoplazmata) v buněčných bankách. Zvláštní pozornost se musí věnovat virům, které mohou běžně kontaminovat druhy, ze kterých je buněčná linie odvozena. Některé buněčné linie obsahují endogenní viry, např. retroviry, jejichž odstranění je nesnadné. Sleduje se proto exprese těchto organismů za různých podmínek, o nichž je známo, že ji mohou indukovat,
d) pro savčí buňky je nutné získat podrobnosti o jejich potenciální schopnosti nádorového bujení.

Kontrola buněk

Za daných podmínek uchovávání a obnovy buněk se pro všechny buněčné banky podrobně dokumentuje původ, forma, uchovávání, použití a stabilita buněk při předpokládaném způsobu použití. Nové buněčné banky se validují v plné míře.

Validace výrobního postupu

Extrakce a čištění

Kapacita každého stupně procesu extrakce a čištění výrobku se validuje vzhledem ke kapacitě odstranění nebo inaktivace kontaminujících látek pocházejících od hostitelské buňky nebo kultivačního média včetně virových částic, bílkovin, nukleových kyselin a přidaných látek.

Validační studie se provádějí tak, aby ukázaly, že výrobní postup běžně splňuje následující kritéria:

- vyloučení cizích látek z výrobku; provedou se studie zahrnující např. viry s odpovídající fyzikálně-chemickou strukturou a zjistí se kapacita snížení těchto kontaminujících látek v každém odpovídajícím stupni čištění,
- přiměřené odstranění vektoru, hostitelských buněk, kultivačního média a kontaminace z chemikálií z výrobku. Kapacita snížení DNK se stanoví metodou záměrné kontaminace. Redukce bílkovin živočišného původu se může stanovit imunochemickými metodami,
- dodržování stanovených limitů výtěžku produktu kultury,
- dostatečná stabilita všech intermediálních produktů anebo přípravy výroby v případě, že se během výroby uvažuje o jejich uchovávání.

Charakteristika látky

Nejprve se ověří totožnost, čistota, účinnost a stabilita konečné várky produktu pomocí širokého spektra chemických, fyzikálních, imunochemických a biologických zkoušek. Před propuštěním výrobce každou šarži výrobku kontroluje na totožnost a čistotu a provede vhodné stanovení obsahu.

Pravidelnost výroby

Provedou se vhodné zkoušky dokládající pravidelnost výroby a čištění. Jsou to zvláště charakteristické zkoušky, prováděné mezioperační zkoušky a zkoušky prováděné u konečného výrobku, jako např.:

- **složení aminokyselin;**
- **částečná aminokyselinová sekvenční analýza.** Sekvenční data umožňují potvrdit správnost N-terminálního zpracování a detekují ztrátu C-terminálních aminokyselin;
- **mapování peptidů.** Chemické nebo enzymatické štěpení bílkovinného produktu a analýza peptidů vhodnou metodou, jako jsou dvourozměrná gelová elektroforéza, kapilární elektroforéza nebo kapalinová chromatografie, neukáže žádné významné rozdíly mezi zkoušenou bílkovinou a referenčním přípravkem. Peptidové mapování může být též použito pro důkaz správných disulfidických vazeb;
- **stanovení molekulové hmotnosti;**
- **udržení klonovaného genu.** Minimální procentuální podíl buněk po kultivaci obsahujících vektor nebo klonovaný gen je stanoven oprávněnou autoritou;
- **celková bílkovina.** Stanoví se výtěžek bílkovin;
- **chemická čistota.** Čistota bílkovinného přípravku se analyzuje vhodnými metodami, jako je kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza nebo polyakrylová gelová elektroforéza s dodecylsíranem sodným v porovnání s referenčním přípravkem.
- **bílkoviny hostitelské buňky.** Pokud není předepsáno jinak, prokazují se bílkoviny hostitelské buňky imunochemickými metodami, např. pomocí polyklonálních antisér proti bílkovinám

hostitelsko-vektorového systému používaného při výrobě přípravku. Mohou se použít následující typy metod: metody vytěsnění v kapalinové fázi (např. radioimunoanalýza), metody přímé vazby v kapalinové fázi a metody přímé vazby pomocí antigenu imobilizovaného na nitrocelulosových (nebo podobných) membránách (např. metoda dot-imunoblot, Western blot). Všeobecné požadavky pro validaci imunochemických metod jsou uvedeny v článku Imunochemické metody *(2.7.1)*. Navíc musí imunochemické metody pro stanovení kontaminace hostitelské buňky vyhovovat následujícím požadavkům:

- *antigenní přípravky.* Antiséra jsou vytvořena proti antigenům připraveným z hostitelského organismu použitého při výrobě, do kterého byl vložen vektor postrádající specifický gen kódující žádanou látku. Tato hostitelská buňka se kultivuje a bílkoviny se extrahují za stejných podmínek kultivace a extrakce jako při výrobě. Pro přípravu antiséra je možno též použít antigeny částečně vyčištěné některým z procesů čištění používaným při výrobě;
- *kalibrace a standardizace*. Kvantitativní údaje se stanoví porovnáním kalibračních křivek vyjadřujících závislost odpovědi na dávce s použitím referenčních přípravků antigenů hostitelských bílkovin. Protože tyto přípravky jsou směsí špatně definovaných bílkovin, referenční přípravek se připraví a kalibruje vhodnou metodou pro stanovení bílkovin. Tento přípravek se uchovává ve vhodném stabilním stavu, který umožňuje jeho použití v delším časovém období;
- *antiséra*. Mají mít vysokou aviditu u protilátek schopných ve směsi antigenů rozpoznat tolik různých bílkovin, kolik je možné, a nedávají vedlejší reakce s výrobkem;

- **DNK pocházející z hostitelské buňky nebo vektoru.** Zbytková DNK se zjišťuje hybridizační analýzou pomocí vhodně citlivé analytické metody nezávislé na sekvenci nebo jinou dostatečně citlivou analytickou metodou.

Hybridizační analýza

Ve zkoušeném vzorku je DNK denaturována na jednovláknovou DNK, imobilizuje se na membráně z nitrocelulosy nebo jiné vhodné membráně a hybridizuje se se značenou DNK připravenou z výrobního hostitelsko-vektorového systému (sonda DNK). V rámci široké možnosti experimentálních přístupů pro stanovení hostitelsko-vektorové DNK mají všechny hybridizační metody splňovat následující kritéria:

- *sondy DNK*. Čištěná DNK se získá z hostitelsko-vektorového systému rostoucího ve stejných podmínkách jako při výrobě. Také se mohou použít vzorky hostitelské chromozomální DNK a vektorové DNK připravené odděleně;
- *kalibrace a standardizace*. Kvantitativní údaje se získají porovnáním s odpověďmi získanými při použití referenčních přípravků. Pro sondy chromozomální DNK a sondy vektorové DNK se použijí referenční přípravky chromozomální DNK a vektorové DNK. Referenční přípravky se kalibrují spektrofotometricky a uchovávají se ve vhodném stabilním stavu, který umožňuje používání po delší časové období;
- *podmínky hybridizace*. Přísnost hybridizačních podmínek zajišťuje specifickou hybridizaci mezi sondami a referenčním přípravkem DNK. Přípravek v použité koncentraci nesmí interferovat s hybridizací.

Metody nezávislé na sekvenci

Vhodné metody zahrnují:

a) detekci sulfonylovaného cytosinového zbytku v jednovláknové DNK (kde DNK je imobilizována na filtru a cytosiny jsou derivatizovány *in situ* před detekcí a kvantitativním stanovením pomocí protilátek proti sulfonové skupině),
b) detekci jednovláknové DNK pomocí fragmentu jednovláknové DNK vázaného na bílkovinu a protilátky proti této bílkovině. Žádný z těchto postupů nepožaduje použití specifické hosti-

telské nebo vektorové DNK jako referenčního přípravku pro stanovení. Nicméně se tato metoda validuje, aby se zajistil rovnoběžný průběh s použitým referenčním přípravkem DNK, linearita odpovědi a to, že přípravek nebo pomocné látky nebudou v použité koncentraci interferovat.

Zkoušky totožnosti, zkoušky na čistotu, stanovení obsahu

Požadavky na konečný výrobek (konečná várka nebo léková forma), kterým vyhovuje po dobu použitelnosti, jakož i specifické zkušební metody jsou uvedeny v jednotlivých článcích.

Uchovávání

Viz jednotlivé články.

Označování

Viz jednotlivé články.

Producta allergenica

Alergenové přípravky

Jsou to přípravky získané z extraktů z přírodních materiálů, které obsahují alergeny, což jsou látky, jež jsou příčinou nebo též podnětem k vyvolání alergického onemocnění (hypersenzitivita). Alergenové složky jsou nejčastěji látky bílkovinné povahy. Tyto přípravky jsou určeny k diagnostice *in vivo* a případně též k léčbě alergických onemocnění (hypersenzitivity), přičítaných těmto alergenům.

Jsou dostupné jako hotové výrobky, jako nerozplněné přípravky v suché formě, roztoky nebo suspenze určené k dalšímu koncentrování nebo ředění před použitím nebo jako konečné přípravky v roztocích, suspenzích nebo lyofilizované. Pokud jsou určeny k podání parenterálnímu, bronchiálnímu a k podání do spojivkového vaku, jsou sterilní.

K *diagnostickým účelům* pro kožní testy se obvykle připravují jako neupravený extrakt v 50% (*V/V*) roztoku glycerolu. Pro intradermální diagnostiku nebo k dráždícím zkouškám při podání do nosu, oka nebo bronchů se připraví vhodné ředění alergenového přípravku zředěním vodného nebo glycerolového extraktu nebo rekonstitucí neupravených lyofilizovaných extraktů bezprostředně před použitím.

Pro *imunoterapii* mohou být alergenovými přípravky neupravené nebo chemicky upravené extrakty, případně též extrakty adsorbované na různé nosiče (např. hydroxid hlinitý, fosforečnan vápenatý nebo tyrosin).

Tento článek se nevztahuje na chemické látky používané výlučně k diagnózám kontaktních dermatitid na chemické syntetické látky, na alergeny připravené rDNK technologií, na konečné přípravky pro jmenovité pacienty. Není nezbytně nutné jej použít pro veterinární alergenové přípravky.

Výroba

Odvozují se od široké řady alergenních výchozích materiálů. Často se připravují jako nerozplněné přípravky určené k dalšímu ředění nebo koncentrování před použitím. Mohou se zpracovat tak, aby se změnila nebo snížila jejich alergenní účinnost, nebo mohou zůstat nezměněny.

Výchozí materiály

Výchozími materiály pro alergenové přípravky jsou ponejvíce pyly, plísně, roztoči, zvířecí epitelie, toxiny blanokřídlého hmyzu a určité potraviny.

Jsou charakterizovány svým původem, podstatou, metodou sběru nebo výroby a předběžného zpracování. Uchovávají se v definovaných podmínkách, které omezují možné znehodnocení.

Sběr nebo výroba stejně jako zacházení s výchozími materiály jsou takové, aby byla od šarže k šarži zaručena, pokud možno, co největší stejnorodost kvalitativního a kvantitativního složení.

Pyly. Omezují se možné chemické kontaminace, jako jsou např. insekticidy a těžké kovy. Pyly obsahují nejvýše 1 % cizích pylů, stanoveno mikroskopicky. Pyly obsahují nejvýše 1 % spor plísní, stanoveno mikroskopicky.

Roztoči a plísně. Biologicky aktivní znečištění, jako jsou mykotoxiny v plísních, se omezuje a jakákoliv jeho přítomnost se vysvětlí. Věnuje se péče na omezení všech alergenních složek v kultivačních půdách a médiích roztočů i plísní sloužících jako výchozí materiály. Kultivační půdy obsahující látky lidského nebo živočišného původu se zdůvodní, a když je to žádáno, vhodně se ošetří tak, aby se inaktivovala nebo vyloučila možná přenosná agens nemocí.

Zvířecí epitelie. Zvířecí epitelie se získávají ze zdravých zvířat vybraných tak, aby se vyloučila možná přenosná agens nemocí.

Výrobní postup

Alergenové přípravky se obecně získávají extrakcí a mohou být purifikovány z výchozích materiálů za použití vhodných metod, které prokazatelně uchovávají biologické vlastnosti alergenních složek. Alergenové přípravky se vyrábějí v podmínkách určených k omezení mikrobiálního pomnožování a enzymatické degradace.

Případný purifikační postup je určen k omezení obsahu potenciálních dráždících složek o nízké molekulové hmotnosti nebo jiných nealergenních složek.

Alergenové přípravky mohou obsahovat vhodnou protimikrobní konzervační látku. Její podstata a koncentrace se zdůvodní.

Výrobní postup zahrnuje různé etapy.

Nativní alergenové extrakty se získávají po separaci z extrahovaných výchozích materiálů.

Polotovary alergenových přípravků se získávají dalším ošetřením nebo modifikací nativních alergenových extraktů. Modifikace se dosáhne chemickými postupy (chemická konjugace) nebo fyzikálními postupy (fyzikální adsorpce na různé nosiče, např. hydroxid hlinitý, fosforečnan vápenatý nebo tyrosin). Mohou být též modifikovány inkluzí do takových nosičů, jako jsou liposomy nebo mikrosféry, nebo adicí na jiná biologicky aktivní činidla ke zlepšení účinnosti nebo bezpečnosti. Mohou se lyofilizovat.

Nerozplněné alergenové přípravky tvoří přípravky v roztoku nebo v suspenzi, které se dále neupravují ani nemodifikují a jsou připraveny k ředění nebo k plnění do konečných obalů.

Laboratorní referenční přípravky

Jako laboratorní referenční přípravek (LRP) se vybere vhodný reprezentační přípravek charakterizovaný a užívaný k ověření stejnorodosti šarží. Uchovává se ve vhodně velkém množství v podmínkách, které zaručují jeho stabilitu; obvykle je lyofilizovaný.

Charakteristika laboratorních referenčních přípravků. *Rozsah charakteristiky laboratorních referenčních přípravků závisí na povaze alergenních výchozích materiálů, znalosti alergenních složek, dostupnosti vhodných zkoumadel a na zamýšleném použití. Charakterizovaný přípravek se používá jako referenční při kontrole šarží nativních alergenových extraktů nebo polotovarů alergenových přípravků a také, je-li to možné, ke kontrole šarží konečných alergenových přípravků.*

Laboratorní referenční přípravek (LRP) se charakterizuje stanovením obsahu bílkovin a profilem bílkovin odpovídajícími metodami (jako je izoelektrická fokusace, elektroforéza na polyakrylamidovém gelu nebo stanovení profilu molekulové hmotnosti). Alergenní složky se mohou zjistit vhodnými metodami (např. imunoblotování nebo dvojrozměrná radioimunoforéza). Charakteristika alergenních složek může obsahovat ověření významných alergenů založené na sérologických nebo jiných technikách užívajících směsi nebo individuální séra od alergických pacientů nebo alergen-specifické polyklonální nebo monoklonální protilátky. Může se provést stanovení obsahu individuálních alergenů, pokud jsou dostupny referenční látky alergenů. Individuální alergeny se identifikují, pokud je to možné, podle mezinárodně ustanoveného názvosloví.

Kde je to možné, stanoví se biologická účinnost LRP metodami *in vivo*, jako je testování na kůži, a vyjádří se v jednotkách biologické účinnosti. Pokud to není možné, může se u některých extraktů stanovit účinnost vhodnými imunoanalýzami (např. těmi, jež jsou založeny na inhibici vazebné kapacity protilátek specifického imunoglobulinu IgE) nebo kvantitativními metodami pro jednotlivou větší složku.

Zkouška totožnosti

Totožnost se potvrdí v mezioperačním nebo jiném vhodném stupni porovnáním s LRP za použití profilování bílkovin vhodnými metodami (např. izoelektrické fokusace, elektroforézy na gelu dodecylsíranu sodného a polyakrylamidu nebo imunoelektroforézy).

Zkoušky na čistotu

Byly vyvinuty různé biochemické a imunologické zkoušky, aby se alergeny charakterizovaly kvalitativně a kvantitativně. Některé z metod, zvláště na stanovení alergenní účinnosti a alergenního profilu, nelze však v současnosti aplikovat na všechny přípravky, protože není dostupná znalost alergenních složek nebo potřebných zkoumadel. Alergenové přípravky byly tedy rozděleny do různých kategorií s rostoucími požadavky zkoušek, a to podle kvality a zamýšleného použití.

Kde je to možné, použijí se následující zkoušky na konečné přípravky. Kde to není možné, tam se tyto zkoušky provedou na extraktech v nejzazším možném stupni výrobního postupu, např. na stupni, který bezprostředně předchází tomu stupni (modifikace, ředění), který již nedovoluje provedení zkoušky na hotovém přípravku.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 5 % u lyofilizovaných přípravků.

Sterilita (*2.6.1*). Přípravky určené k parenterálnímu a bronchiálnímu podání a k podání do spojivkového vaku vyhovují zkoušce na sterilitu.

Obsah bílkovin. 80 % až 120 % u dané šarže deklarovaného obsahu. Pokud lze stanovit biologickou účinnost, může se stanovení obsahu bílkovin vypustit.

Bílkovinný profil. Složení bílkoviny provedené vhodnými metodami odpovídá složení bílkovin LRP.

Neškodnost (*2.6.9*). Přípravky získané z plísní a určené k parenterálnímu podání (s výjimkou kožních testů) vyhovují zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití.

U přípravků k terapeutickému a případně k diagnostickému použití se mohou provést různé dodatečné zkoušky se vzrůstající selektivitou, zvláště pak validované stanovení účinnosti (celková alergenní účinnost, stanovení jednotlivých alergenů nebo některé jiné oprávněné zkoušky).

Hliník (*2.5.13*). 80 % až 120 % deklarovaného množství, ale v každém případě nejvýše 1,25 mg v jedné lidské dávce, pokud není jinak ospravedlněno a schváleno; stanoví se, je-li použit jako adsorbent hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý.

Vápník (*2.5.14*). 80 % až 120 % deklarovaného množství; stanoví se, je-li použit jako adsorbent fosforečnan vápenatý.

Antigenní profil. Antigeny se identifikují pomocí vhodných metod za použití antigen-specifických zvířecích protilátek.

Alergenní profil. Relevantní alergenní složky se identifikují pomocí vhodných metod za použití alergen-specifických lidských protilátek.

Celková alergenní účinnost. 50 % až 200 % deklarovaného množství při stanovení inhibice vazebné kapacity protilátek specifického imunoglobulinu E nebo vhodnou odpovídající metodou *in vitro*.

Individuální alergeny. 50 % až 200 % deklarovaného množství; stanoví se vhodnou metodou.

Uchovávání

Adsorbované alergenní přípravky nesmějí zmrznout.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- biologická účinnost a případně též obsah bílkovin a případně též extrakční poměr,
- způsob podání a zamýšlené použití,
- podmínky uchovávání,
- kde je to vhodné, též název a množství přidané protimikrobní konzervační látky,
- *u lyofilizovaných přípravků*:
  - název, složení a objem tekutiny, jež se má přidat k rekonstituci,
  - doba, po kterou se přípravek po rekonstituci může použít,
- zda je přípravek sterilní,
- kde je to vhodné, též název a množství adsorbentu.

Pulveres adspersorii

Zásypy

Synonyma. Pulveres ad usum dermicum, topické prášky

Kde je předepsáno a schváleno, požadavky tohoto článku se nevztahují na zásypy určené pro veterinární použití.

Jsou to přípravky tvořené pevnými sypkými suchými částicemi různého stupně rozdrobnění. Obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami nebo bez nich, a je-li potřebné, barviva schválená oprávněnou autoritou.

Jsou to jednodávkové (dělené) nebo vícedávkové (nedělené) přípravky. Jsou bez větších shluků částic. Zásypy určené na otevřené rány nebo na vážně poškozenou kůži jsou sterilní.

Vícedávkové zásypy lze dodávat v obalech se sypacím víčkem, nádobách s mechanickým rozprašovačem nebo v tlakových nádobkách.

Zásypy balené v tlakových nádobách vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu*.

Obaly pro zásypy, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Výroba

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci zásypů se používá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Sterilní zásypy jsou vyráběny za použití materiálu a metod určených k zajištění sterility a k zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; příslušná doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Zkoušení

Velikost částic. Je-li předepsáno, velikost částic zásypu se stanoví pomocí sít *(2.9.12)* nebo jinou vhodnou metodou.

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, jednodávkové zásypy s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají uvedeným podmínkám. Zkouška se neprovádí u přípravků multivitaminových a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Jednodávkové zásypy vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené účinné látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Sterilita *(2.6.1)*. Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- že je přípravek pro zevní užití,
- zda je přípravek sterilní.

Pulveres perorales

Perorální prášky

Požadavky na prášky používané k přípravě perorálních roztoků nebo suspenzí jsou uvedeny v článku Liquida peroralia. Kde je předepsáno a schváleno, požadavky tohoto článku se nevztahují na perorální prášky určené pro veterinární použití.

Jsou to přípravky tvořené pevnými sypkými suchými částicemi různého stupně rozdrobnění. Obsahují jednu nebo více léčivých látek s pomocnými látkami nebo bez nich, a je-li potřebné, barviva schválená oprávněnou autoritou a chuťové a aromatické přísady. Perorální prášky lze polykat přímo nebo jsou podávány s vodou nebo jinou vhodnou tekutinou. Jsou to jednodávkové (dělené) nebo vícedávkové (nedělené) přípravky.

Obaly pro prášky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části). Vícedávkové perorální prášky jsou opatřeny odměrkou umožňující podání předepsané dávky. Každá dávka jednodávkového prášku je v jednotlivém obalu, např. v sáčku, papírovém váčku nebo lahvičce.

Výroba

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci prášků se používá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Zkoušení

Velikost částic. Je-li předepsáno, velikost částic prášku se stanoví pomocí sít *(2.9.12)* nebo jinou vhodnou metodou.

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, jednodávkové prášky s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce B na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají uvedeným podmínkám. Zkouška se neprovádí u přípravků multivitaminových a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Jednodávkové prášky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené účinné látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, nebo obsahuje-li přípravek prchavé látky, ve vzduchotěsných obalech.

Pulveres effervescentes

Šumivé prášky
Synonymum. Šumivé práškové směsi

Jsou to jednodávkové nebo vícedávkové prášky obsahující kyseliny a uhličitany nebo hydrogenuhličitany, které za přítomnosti vody prudce reagují za vzniku oxidu uhličitého. Jsou určeny k rozpuštění nebo dispergaci ve vodě před podáním.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech.

Rectalia

Rektální přípravky

Jsou to přípravky určené k rektální aplikaci s místním nebo systémovým účinkem nebo podávané k diagnostickým účelům.

Obaly pro rektální přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů rektálních přípravků:
- čípky,
- rektální tobolky,
- rektální roztoky a suspenze,
- prášky a tablety pro rektální roztoky a suspenze,
- polotuhé rektální přípravky,
- rektální pěny,
- rektální tampony s léčivy.

Výroba

Při vývoji rektálního přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek *(5.1.3)*.

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci rektálních přípravků je vhodnými způsoby zajištěna jejich mikrobiální čistota; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Při výrobě polotuhých a tekutých rektálních přípravků obsahujících dispergované částice se používají měření k zajištění vhodné a kontrolované velikosti částic pro určené použití.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, pevné nebo tuhé jednodávkové lékové formy s obsahem léčivé látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A (tablety) nebo zkoušce B (čípky, rektální tobolky) na obsahovou stejnoměr-

nost jednodávkových přípravků. Obsahuje-li přípravek více léčivých látek, požadavek zkoušky se vztahuje jen na ty látky, které odpovídají uvedeným podmínkám.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Pevné nebo tuhé jednodávkové lékové formy vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny přítomné léčivé látky, zkouška na hmotnostní stejnoměrnost se neprovádí.

Disoluce. Použije se vhodná zkouška k prokázání příslušného uvolňování léčivé látky (látek) z pevných a tuhých jednodávkových lékových forem, např. zkouška disoluce čípků a měkkých tobolek *(2.9.3)*.

Provádí-li se zkouška disoluce, neprovádí se zkouška rozpadavosti.

Označování

V označení na obalu se uvedou názvy všech protimikrobních přísad.

Suppositoria

Čípky

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky. Tvarem, velikostí a konzistencí jsou vhodné pro podání do konečníku.

Čípky obsahují jednu nebo více léčivých látek dispergovaných nebo rozpuštěných v jednoduchém nebo ve složeném čípkovém základu, který je rozpustný nebo dispergovatelný ve vodě nebo taje při teplotě těla. Je-li to potřebné, mohou být přidány pomocné látky, jako jsou rozpouštědla, látky s adsorpčními vlastnostmi, povrchově aktivní látky, kluzné látky, protimikrobní přísady a barviva schválená oprávněnou autoritou.

Výroba

Čípky jsou připravovány lisováním nebo litím. Je-li třeba, léčivé látky jsou rozdrobněny a přesáty vhodným sítem. Jsou-li připravovány litím, hmota s léčivými látkami (čípkovina) je zahřátím roztavena a lita do vhodných forem. Následným ochlazením čípky ztuhnou. Pro tento způsob přípravy jsou vhodné různé pomocné látky, jako např. tuhý tuk, makrogoly, kakaový olej, a různé gelotvorné směsi tvořené např. želatinou, vodou a glycerolem.

Použije se vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování účinné látky (látek) z přípravku s řízeným uvolňováním nebo s prodlouženým místním účinkem.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků *(2.9.2)*. Čípky s mastným základem se kontrolují po 30 min a čípky se základem rozpustným ve vodě se kontrolují po 60 min, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Capsulae rectales

Rektální tobolky
Synonymum. Rektální kapsle

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky obecně podobné měkkým tobolkám popsaným v článku *Capsules*, od nichž se liší možností použití lubrifikačního potahu. Jsou protáhlého tvaru, hladké a mají jednotný vnější vzhled.

Výroba

Použije se vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování účinné látky (látek) z přípravku s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků *(2.9.2)*. Rektální tobolky se hodnotí po 30 min, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Solutiones et suspensiones rectales

Rektální roztoky a suspenze
Synonymum. Klyzmata

Jsou to tekuté přípravky určené k rektálnímu podání s celkovým nebo místním účinkem nebo k diagnostickým účelům.

Jsou to jednodávkové přípravky obsahující jednu nebo více léčivých látek rozpuštěných nebo dispergovaných ve vodě, glycerolu nebo makrogolech. Suspenze mohou obsahovat sediment, který se snadno roztřepe; takto vzniklá suspenze je natolik stabilní, aby bylo umožněno podání správné dávky.

Rektální roztoky a suspenze mohou obsahovat pomocné látky, např. k úpravě viskozity přípravku, úpravě a stabilizaci pH, zvýšení rozpustnosti léčivé látky (látek) nebo ke stabilizaci přípravku. Tyto pomocné látky nemají nepříznivě ovlivňovat léčebný účinek nebo v použitých koncentracích být příčinou přílišné místní dráždivosti.

Rektální roztoky a suspenze jsou dodávány v obalech o obsahu 2,5 ml až 2000 ml. Obal je upraven k podání přípravku do konečníku nebo je přiložen vhodný aplikátor.

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, rektální suspenze vyhovují následující zkoušce. Vyprázdní se co nejvíce každý obal a stanoví se jednotlivé obsahy. Vyhovují zkoušce B.

Hmotnostní stejnoměrnost. Rektální roztoky vyhovují následující zkoušce. Zváží se jednotlivě obsah dvaceti obalů vyprázdněných, jak lze nejvíce, a vypočte se průměrná hmotnost. Pro přípravky s hmotností do 100 g nejvíce dvě jednotlivé hmotnosti se odlišují od průměrné hmotnosti o více než 10 % a žádná se neliší o více než 20 %. U přípravků s hmotností nad 100 g nejvíce dvě jednotlivé hmotnosti se odlišují od průměrné hmotnosti o více než 5 % a žádná se neliší o více než 10 %.

Pulveres et tabulettae rectales pro solutionibus et suspensionibus
Prášky a tablety pro rektální roztoky a suspenze

Jsou to jednodávkové přípravky, které jsou rozpouštěny nebo dispergovány ve vodě v čas potřeby před podáním. Mohou obsahovat pomocné látky k usnadnění rozpouštění nebo dispergace nebo k zabránění shlukování částic.

Po rozpuštění nebo dispergaci vyhovují požadavkům na rektální roztoky nebo rektální suspenze, jak je to vhodné.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Tablety pro rektální roztoky nebo suspenze se rozpadají do 3 min při zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek *(2.9.1)*, ale používá se *voda R* při 15 °C až 25 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- návod na přípravu rektálního roztoku nebo suspenze,
- podmínky a doba uchovávání roztoku nebo suspenze po přípravě.

Rectalia semisolida
Polotuhé rektální přípravky

Jsou to masti, krémy nebo gely.

Jsou často dodávány jako jednodávkové přípravky v obalech s vhodným aplikátorem.

Polotuhé rektální přípravky vyhovují požadavkům článku *Unguenta*.

Spumae rectales
Rektální pěny

Vyhovují požadavkům článku *Spumae medicatae*.

Tampona rectalia medicata
Rektální tampony

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené k zavedení do konečníku na určenou dobu.

Vyhovují požadavkům článku *Tampona medicata*.

Species

N

Čajové směsi

Jsou to směsi drog rozdrobněných nebo nerozdrobněných na předepsanou velikost částic, někdy i s přísadou dalších léčivých látek, určené nejčastěji k přípravě vodných nálevů nebo odvarů.

Příprava

Čajové směsi se připravují smícháním drog nerozdrobněných nebo rozdrobněných na předepsanou velikost částic, viz Stupeň rozdrobnění N. Drogy se míchají postupně v pořadí podle hmotnosti jednotlivých složek, počínaje drogami předepsanými v největším množství. Plody a semena se přidávají nakonec.

Jsou-li předepsány přísady léčivých látek, používají se ve formě roztoků, kterými se provlhčí buď celá směs, nebo jen ty drogy, kterými roztok dobře proniká a jejichž obsahové látky působením rozpouštědla podléhají co nejmenším změnám. Provlhčené (impregnované drogy) se ihned suší v tenké vrstvě při teplotě do 40 °C a po usušení se míchají s ostatními složkami čajové směsi.

Hotové čajové směsi se zbaví prachového podílu prosátím sítem 250 a znovu se promíchají. Čerstvě připravené čajové směsi se nemíchají se zbytky staré zásoby.

Čajové směsi k obkladům se připravují z drog hrubě práškovaných.

Jednotlivé složky čajové směsi mají být, pokud možno, stejnoměrně rozděleny. Pokud dochází k jejich snadnému oddělování z čajové směsi, čajová směs se před vydáním znovu promíchá.

Zkouška totožnosti

Jednotlivé složky čajové směsi, viz Zkouška na čistotu, se hodnotí postupy uvedenými v článcích příslušných drog.

Zkouška na čistotu

Stanovení jednotlivých součástí čajové směsi. Podle charakteru a stupně rozdrobnění drog se odváží z dobře promíchané čajové směsi vzorek o hmotnosti 5,0 g až 20,0 g. Jednotlivé drogy se pinzetou (je-li třeba za použití lupy) oddělí a každá zvlášť se zváží.

Odchylka od deklarované hmotnosti každé ze složek čajové směsi je nejvýše ±10 %; dvou ze složek čajové směsi je nejvýše ±25 %; jedné ze složek čajové směsi je nejvýše ±30 %.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněny před světlem.

Spumae medicatae

Léčivé pěny

Synonyma. Musci medicati, pěny s léčivy

Doplňující požadavky na léčivé pěny různých typů jsou uvedeny v dalších obecných článcích, např. Rectalia, Vaginalia a Liquida ad usum dermicum.

Jsou to přípravky tvořené velkým objemem plynu dispergovaného v tekutině obsahující zpravidla jednu nebo několik léčivých látek, povrchově aktivní látku umožňující tvorbu pěny a různé další pomocné látky. Pěny s léčivy jsou obvykle určeny k aplikaci na kůži nebo sliznice.

Léčivé pěny se obvykle tvoří při aplikaci tekutých přípravků z tlakového balení. Tlaková nádoba je vybavena ventilem a rozprašovačem na pěnu.

Léčivé pěny určené k použití na vážně poškozenou kůži a na velké otevřené rány jsou sterilní.

Léčivé pěny dodávané v tlakovém balení vyhovují požadavkům článku *Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu*.

Výroba

Sterilní léčivé pěny se vyrábějí za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a k zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Zkoušení

Relativní hustota pěny. Tlaková nádoba se uchovává nejméně 24 h při teplotě asi 25 °C. Při manipulaci je třeba přípravek chránit před zahřátím. K výstupu rozprašovače na pěnu se připojí pevná trubička délky 70 mm až 100 mm a vnitřního průměru 1 mm. Nádobou se zatřepe, aby se zajistila homogenita tekuté fáze, a 5 ml až 10 ml pěny se odstříkne do odpadu. Odváží se miska s plochým dnem o objemu asi 60 ml a výšky asi 35 mm a konec trubičky připojené k výstupu tlačítka ventilu se přiloží ke dnu misky a za krouživého pohybu se po stlačení ventilu miska rovnoměrně naplní pěnou. Jakmile pěnění ustane, zarovná se povrch pěny vhodnou stěrkou a přebytek pěny se odstraní. Vážením se potom určí hmotnost pěny a hmotnost stejného objemu *vody R* naplněné do misky.

Relativní hustota pěny je dána vztahem:

$$m/e\ ,$$

v němž značí:

m - hmotnost zkoušeného přípravku pěny v gramech,

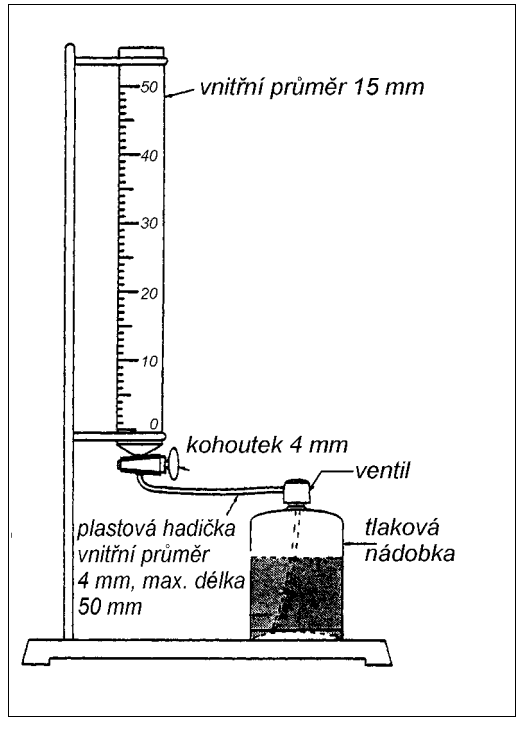
e - hmotnost stejného objemu *vody R* v gramech.

Zkouška se provede třikrát, přičemž žádný z výsledků se neliší od průměrné hodnoty o více než 20 %.

Doba napěnění. Zařízení, viz obrázek 1, tvoří byreta na 50 ml o vnitřním průměru 15 mm s dělením po 0,1 ml uzavřená jednocestným kohoutem s otvorem 4 mm. Vyznačení objemu 30 ml je nejméně 210 mm nad osou kohoutu. Dolní část byrety je spojena s výstupem z rozprašovače na pěnu pomocí hadičky z plastu, která je dlouhá nejvýše 50 mm a má vnitřní průměr 4 mm. Tlaková nádoba byla před měřením uchovávána nejméně 24 h při teplotě asi 25 °C. S nádobou se zatřepe, aby se tekutá fáze zhomogenizovala, a 5 ml až 10 ml pěny se odstříkne do odpadu. Po připojení výstupu z rozprašovače na pěnu k výpusti byrety se jedním stlačením ventilu vystříkne asi 30 ml pěny. Kohout se uzavře a současně se začne odečítat čas. Sledují se změny objemu pěny v byretě. Každých 10 s se zaznamená zvětšující se objem až do největšího objemu.

Zkouška se provede třikrát. Žádný z časů potřebných k dosažení největšího objemu není delší než 5 min.

Sterilita *(2.6.1)*. Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.



Obr. 1.

Označování

V označení na obalu se uvede, zda je přípravek sterilní.

Styli

Tyčinky

Doplňující požadavky na tyčinky různých typů lze nalézt v dalších obecných článcích, např. Nasalia.

Jsou to tuhé přípravky určené k místnímu podání. Jsou to válcovité nebo kónické přípravky tvořené jednou nebo více léčivými látkami samotnými nebo jsou tato léčiva rozpuštěna nebo dispergována v jednoduchém nebo složeném základu, který se může rozpouštět nebo tát při teplotě těla.

Uretrální tyčinky a tyčinky určené k vložení do ran jsou sterilní.

Výroba

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tyčinek se využívá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Uretrální a jiné sterilní tyčinky jsou vyráběny za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při přípravě tyčinek se využívají způsoby zajišťující, aby přípravek vyhověl zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost nebo, kde je to vhodné, zkoušce na obsahovou stejnoměrnost.

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Uretrální tyčinky a tyčinky určené k vložení do ran vyhovují zkoušce na sterilitu.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- množství léčivé látky (látek) v jedné tyčince,
- u uretrálních tyčinek a tyčinek určených k vložení do ran, že přípravek je sterilní.

Tabulettae

1998

Tablety

Synonymum. Compressi

Požadavky tohoto článku se nevztahují nutně na přípravky, které jsou označeny jako tablety, ale jsou podávány jinak než perorálně. Požadavky na tyto přípravky lze nalézt v případě potřeby v jiných obecných článcích, např. Rectalia a Vaginalia. Je-li předepsáno a schváleno jinak, požadavky tohoto článku se nevztahují na tablety pro veterinární použití.

Jsou to tuhé mechanicky pevné přípravky s obsahem jedné dávky léčivé látky nebo látek v jedné tabletě. Jsou určeny k perorálnímu podání. Některé tablety se polykají celé, některé se žvýkají, některé se před podáním rozpouštějí nebo dispergují ve vodě a některé se ponechají v ústech, kde se z nich uvolňuje léčivá látka.

Tablety jsou tvořeny jednou nebo více léčivými látkami s pomocnými látkami nebo bez nich. Pomocnými látkami jsou plniva, pojiva, vlhčiva, rozvolňovadla, látky kluzné, látky modifikující uvolňování léčiv, barviva schválená oprávněnou autoritou a chuťové a aromatické přísady.

Tablety jsou obvykle válcovitého tvaru, ploché nebo čočkovité, hrany mohou být zkosené. Mohou mít rýhy k usnadnění jejich rozdělení a mohou být označeny nápisem nebo značkami. Tablety mohou být obalené.

Obaly pro tablety, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů tablet:
- neobalené tablety,
- obalené tablety,
- šumivé tablety,
- tablety pro přípravu roztoku,
- tablety pro přípravu disperze,
- enterosolventní tablety,
- tablety s řízeným uvolňováním,
- tablety působící v ústech.

Výroba

Tablety se vyrábějí lisováním stejných objemů částic nebo shluků částic vyrobených granulačními metodami. Při výrobě tablet a zejména jader pro obalené tablety se zajistí vhodná mechanická pevnost, aby se při manipulaci nedrobily a nelámaly. To lze ověřit měřením oděru neobalených tablet *(2.9.7)* a jejich pevnosti *(2.9.8)*.

Žvýkací tablety se vyrábějí tak, aby bylo dosaženo jejich vhodných vlastností pro tento způsob podání.

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci tablet se používá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, tablety s obsahem účinné látky menším než 2 mg nebo méně než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají uvedeným podmínkám. Zkouška se nevyžaduje u přípravků multivitaminových a se stopovými prvky.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Neobalené tablety, pokud není předepsáno a schváleno jinak, a filmem potažené tablety vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené účinné látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Disoluce. Vhodnou zkouškou se prokáže příslušné uvolňování léčivé látky (látek), např. jedna ze zkoušek popsaných ve stati Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem *(2.9.3)*.

V případě, že je předepsána zkouška disoluce, neprovádí se zkouška rozpadavosti.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněny před rozdrcením a mechanickým nárazem.

Tabulettae non obductae

Neobalené tablety

Jsou to jednovrstevné tablety vzniklé prostým lisováním částic a vícevrstevné tablety skládající se ze soustředných nebo souběžných vrstev získaných postupným lisováním částic různého složení. Použité pomocné látky nejsou výslovně určeny k řízení uvolňování léčivé látky v trávicích tekutinách.

Neobalené tablety mají obecné znaky tablet. Na lomu pozorovaném pod lupou je patrna stejnoměrná struktura (jednovrstevné tablety) nebo vrstevnatá struktura (vícevrstevné tablety), ale nejsou patrné žádné známky obalování.

Zkoušení

Rozpadavost. Neobalené tablety vyhovují zkoušce na rozpadavost tablet a tobolek (*2.9.1*) za použití *vody R* jako tekutiny. Do každé trubice se přidá disk. Přístroj se uvede do chodu na 15 min, pokud není předepsáno a schváleno jinak, a potom se kontroluje stav tablet. Jestliže se tablety přilepily na disky, zkoušku nelze hodnotit, opakuje se zkouška s dalšími šesti tabletami bez disků. Tablety vyhovují zkoušce, jestliže se rozpadlo všech šest tablet.

U žvýkacích tablet se tato zkouška nevyžaduje.

Tabulettae obductae

Obalené tablety

Synonyma. Obalované tablety, dražé, potahované tablety

Obalené tablety jsou tablety tvořené jádry pokrytými jednou vrstvou (potahované tablety, filmem potažené tablety) nebo více vrstvami (dražované tablety nebo tablety s nalisovaným obalem) ze směsi různých látek, jako jsou přírodní nebo syntetické pryskyřice, gumy, želatina, neaktivní a nerozpustná plniva, cukry, změkčovadla (plastifikátory), polyalkoholy, vosky, povolená barviva, někdy chuťové a aromatické přísady a léčivé látky. Látky určené k obalování jsou obvykle nanášeny ve formě roztoků nebo disperzí, za podmínek umožňujících odpaření rozpouštědla. Je-li obalovou vrstvou velmi tenká vrstva polymeru, jedná se o potahované tablety.

Obalené tablety mají hladký povrch, který je často zbarven a může být leštěný. Na lomu pozorovaném pod lupou je patrné jádro obklopené jednou nebo více souvislými vrstvami rozdílné struktury.

Zkoušení

Rozpadavost. Obalené tablety s výjimkou potahovaných tablet vyhovují následující zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek (*2.9.1*) za použití *vody R* jako tekutiny. Do každé trubice se přidá disk. Přístroj se uvede do chodu na 60 min, pokud není předepsáno a schváleno jinak, a potom se pozoruje stav tablet. Jestliže tablety nevyhovují zkoušce, opakuje se zkouška s dalšími šesti tabletami a místo *vody R* se použije *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS.* Tablety vyhovují zkoušce, jestliže se v kyselém prostředí rozpadlo všech šest tablet.

Potahované tablety vyhovují zkoušce pro neobalené tablety s tím, že přístroj se uvede do chodu na 30 min, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Jestliže se obalené nebo potahované tablety přilepily na disky, zkoušku nelze hodnotit, opakuje se zkouška s dalšími šesti tabletami bez disků. Tablety vyhovují zkoušce, jestliže se rozpadlo všech šest tablet.

U obalených žvýkacích tablet se tato zkouška neprovádí.

Tabulettae effervescentes

Šumivé tablety

Jsou to neobalené tablety obsahující kyseliny a uhličitany nebo hydrogenuhličitany, které za přítomnosti vody prudce reagují za vzniku oxidu uhličitého. Jsou určeny k rozpuštění nebo dispergaci ve vodě před podáním.

Zkoušení

Rozpadavost. Jedna tableta se umístí do nádoby s 200 ml *vody R* při 15 °C až 25 °C a sleduje se vznik bublinek. Když se zastaví uvolňování plynu z tablety nebo jejích částí, tableta je rozpadlá, a to buď rozpuštěná, nebo dispergovaná ve vodě tak, že nezbyly žádné shluky částic. Zkouška se opakuje s dalšími pěti tabletami. Tablety vyhovují zkoušce, když se každá ze šesti tablet rozpadla za popsaných podmínek do 5 min, není-li předepsáno a schváleno jinak.

Tabulettae pro solutione

Tablety pro přípravu roztoku

Synonymum. Rozpustné tablety

Jsou to neobalené nebo potahované tablety. Jsou určeny k rozpuštění ve vodě před podáním. Vzniklý roztok může slabě opalizovat v závislosti na vlastnostech látek použitých při výrobě tablet.

Zkoušení

Rozpadavost. Tablety pro přípravu roztoků se rozpadají do 3 min při zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek *(2.9.1)* za použití *vody R* při teplotě 15 °C až 25 °C.

Tabulettae pro dispersione

Tablety pro přípravu disperze

Jsou to neobalené nebo potahované tablety určené před podáním k dispergaci ve vodě za vzniku homogenní disperze.

Zkoušení

Rozpadavost. Tablety pro disperze se rozpadají do 3 min při zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek *(2.9.1)* za použití *vody R* při teplotě 15 °C až 25 °C.

Jemnost disperze. Do 100 ml *vody R* se dají dvě tablety a míchá se, dokud se zcela nerozptýlí. Vznikne rovnoměrná disperze, která projde sítem (710 µm).

Tabulettae enterosolventes

Enterosolventní tablety
Synonymum. Acidorezistentní tablety

Je to druh tablet s řízeným uvolňováním odolných vůči žaludeční tekutině a uvolňujících léčivou látku (látky) ve střevní tekutině. Jsou připraveny buď pokrytím tablet acidorezistentním obalem, nebo jsou tvořeny zrněnými prášky nebo částicemi již potaženými acidorezistentním obalem.

Tablety s acidorezistentním obalem mají charakter obalených tablet.

Výroba

U tablet připravených ze zrněných prášků nebo částic již pokrytých acidorezistentním obalem se použije vhodná zkouška k ověření požadovaného uvolňování léčivé látky (látek).

Zkoušení

Rozpadavost. U tablet s acidorezistentním obalem se provede zkouška rozpadavosti *(2.9.1)* s následující úpravou. Jako tekutina se použije *kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l RS*. Přístroj bez disků se uvede do chodu na dobu 2 h nebo jinou schválenou dobu a potom se sleduje stav tablet. Doba rezistence vůči kyselému prostředí se mění podle složení zkoušených tablet. Obvykle jsou to 2 h až 3 h, ale i při schválení odchylky není doba menší než 1 h. Žádná tableta nevykazuje známky rozpadu (kromě úlomků obalu) nebo praskliny, které by umožnily únik obsahu. Pak se nahradí kyselina *tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 6,8* a do každé trubice se přidá disk. Přístroj se uvede do chodu na 60 min a potom se sleduje stav tablet. Jestliže se přilepily na disky, zkoušku nelze hodnotit, opakuje se zkouška s dalšími šesti tabletami bez disků. Tablety vyhovují zkoušce, jestliže se rozpadlo všech šest tablet.

Tabulettae cum liberatione modificata

Tablety s řízeným uvolňováním
Synonyma. Tablety s modifikovanou liberací, retardované tablety, retardety

Jsou to obalené nebo neobalené tablety připravené pomocí vybraných pomocných látek nebo vybraných postupů použitých samostatně nebo v kombinaci tak, aby se dosáhlo vhodné rychlosti uvolňování nebo místa uvolňování účinné látky (látek).

Výroba

Požadované uvolňování léčivé látky (látek) nebo přísad se ověří vhodnou zkouškou.

Tabulettae orales

Tablety působící v dutině ústní

Jsou to obvykle neobalené tablety. Jsou určeny k pomalému uvolňování a místnímu účinku léčivé látky (látek) nebo k uvolňování a vstřebávání léčivé látky (látek) nebo látek v určité části úst.

Tampona medicata

Tampony s léčivy

Synonymum. Léčivé tampony

Doplňující požadavky na tampony s léčivy různých typů jsou uvedeny v dalších obecných článcích, např. Rectalia, Vaginalia a Auricularia.

Jsou to pevné jednodávkové přípravky určené k vložení do tělních dutin na omezenou dobu. Jsou tvořeny vhodným materiálem, jako je celulosa, kolagen nebo silikon, impregnovaným jedním nebo více léčivými látkami.

Výroba

Při výrobě, balení, skladování a distribuci tamponů s léčivy se využívá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků *(5.1.4)*.

Označování

V označení na obalu se uvede množství léčivé látky (látek) v jednom tamponu.

Tincturae

Tinktury

Tinktury jsou tekuté přípravky obvykle získávané z usušených rostlinných nebo živočišných drog.

U některých přípravků může být výchozí droga předem upravena, například inaktivací enzymů, rozdrobněním nebo odtučněním.

Tinktury se připravují macerací, perkolací nebo jinými vhodnými validovanými metodami za použití lihu vhodné koncentrace. Mohou být také připravovány rozpouštěním nebo zředěním extraktů lihem vhodné koncentrace.

Obvykle se připravují z jednoho dílu drogy a deseti dílů vyluhovadla nebo jednoho dílu drogy a pěti dílů vyluhovadla.

Jsou obvykle čiré. Stáním se může vyloučit mírný sediment, pokud se složení významně nezmění.

Příprava

Perkolací. Je-li třeba, rozdrobní se výchozí droga na částice vhodné velikosti, důkladně se promíchá s částí předepsaného vyluhovadla a nechá se vhodnou dobu stát. Pak se převede do perkolátoru a perkoluje se pomalu tak, aby extrahovaný materiál byl vždy překryt vyluhovadlem. Zbylá droga po extrakci se vylisuje a získaná tekutina se smíchá s perkolátem.

Macerací. Není-li jinak předepsáno, rozdrobní se výchozí droga na částice vhodné velikosti, důkladně se promíchá s předepsaným vyluhovadlem a nechá se stát v uzavřené nádobě vhodnou dobu. Zbylá droga po extrakci se oddělí od vyluhovadla, a je-li třeba, vylisuje se. V tomto případě se obě tekutiny spojí.

Přípravou z extraktů. Tinktura se připraví rozpuštěním nebo zředěním extraktu lihem vhodné koncentrace. Obsah lihu a účinných látek, nebo je-li to vhodnější, obsah lihu a zbytek po odpaření odpovídá hodnotám tinktur získaných macerací nebo perkolací.

Úpravou obsahu účinných látek. Je-li třeba, obsah účinných látek se upraví buď přidáním vyluhovadla vhodné koncentrace, nebo přidáním jiné tinktury z téhož rostlinného nebo živočišného materiálu použitého k přípravě.

Zkoušení

Relativní hustota *(2.2.5)*. Vyhovuje požadavkům uvedeným v příslušných článcích.

Obsah ethanolu *(2.9.10)*. Vyhovuje předepsaným požadavkům.

Methanol a 2-propanol *(2.9.11)*. Nejvýše 0,05 % (*V/V*) methanolu a nejvýše 0,05 % *(V/V)* 2-propanolu, není-li předepsáno jinak.

Zbytek po odpaření. Vyhovuje požadavkům uvedeným v příslušných článcích. Do odpařovací misky s plochým dnem o průměru asi 50 mm a výšce asi 30 mm se rychle převedou 2,00 g nebo 2,0 ml tinktury. Odpaří se do sucha na vodní lázni a suší se 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* se zváží.

Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech nebo v gramech na litr.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech, chráněny před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název rostlinné nebo živočišné drogy použité k přípravě,
- zda byl použit čerstvý rostlinný nebo živočišný výchozí materiál,
- koncentrace lihu použitého k přípravě,
- koncentrace lihu v hotovém přípravku,
- obsah účinných látek nebo poměr výchozí drogy k vyluhovadlu nebo poměr výchozí drogy k hotovému přípravku.

Unguenta

Topické polotuhé přípravky

Požadavky tohoto článku platí pro všechny topické polotuhé přípravky. U polotuhých přípravků určených k aplikaci na specifické povrchy kůže nebo sliznice jsou doplňující požadavky uvedeny v příslušných článcích, např. Auricularia, Ocularia, Nasalia, Rectalia a Vaginalia.

Jsou to přípravky určené k aplikaci na kůži nebo sliznice s místním účinkem, k penetraci léčivých látek kůží nebo se změkčovacím, popř. ochranným účinkem. Mají homogenní vzhled.

Topické polotuhé přípravky jsou tvořeny jednoduchým nebo složeným základem, v němž je zpravidla rozpuštěna, emulgována nebo suspendována jedna nebo více léčivých látek. Složením základu lze ovlivňovat účinnost přípravku a uvolňování léčivé látky (látek).

Základy mohou obsahovat přírodní nebo syntetické látky; mohou to být jednofázové nebo vícefázové systémy. Podle povahy základu mají přípravky hydrofilní nebo hydrofobní (lipofilní) vlastnosti; mohou obsahovat vhodné pomocné látky, jako jsou protimikrobní přísady, antioxidanty, stabilizátory, emulgátory a látky zvyšující viskozitu.

Topické polotuhé přípravky určené k aplikaci na velké otevřené rány a na vážně poškozenou kůži jsou sterilní.

Obaly pro topické polotuhé přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů topických polotuhých přípravků:
- masti,
- krémy,
- gely,
- pasty.

Výroba

Při vývoji topického polotuhého přípravku obsahujícího protimikrobní přísadu má být prokázána účinnost této přísady k uspokojení oprávněné autority. Vhodná metoda zkoušení spolu s kritérii pro posouzení konzervačních vlastností v daném složení přípravku je popsána ve stati Účinnost protimikrobních konzervačních látek (*5.1.3*).

Při výrobě, balení, skladování a distribuci topických polotuhých přípravků se využívají vhodné způsoby zajištění jejich mikrobiální čistoty; odpovídající doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.5*).

Sterilní topické polotuhé přípravky jsou vyráběny za použití materiálů a metod určených k zajištění sterility a zabránění kontaminace a množení mikroorganismů; odpovídající doporučení jsou ve stati Metody přípravy sterilních výrobků (*5.1.1*).

Při výrobě topických polotuhých přípravků obsahujících emulgované nebo suspendované částice se měří velikost dispergovaných částic k zajištění jejich vhodné velikosti vzhledem k určenému použití.

Zkoušení

Sterilita *(2.6.1)*. Je-li přípravek označen jako sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech nebo, jestliže přípravek obsahuje vodu a jiné vypařující se látky, uchovává se ve vzduchotěsných obalech. Obaly jsou přednostně stlačitelné kovové tuby, z nichž lze přípravek vytlačovat. Je-li přípravek sterilní, uchovává se ve sterilních vzduchotěsných zabezpečených obalech.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název všech protimikrobních přísad,
- zda je přípravek sterilní.

Unguenta cum monophasali vehiculo
Masti

Jsou tvořeny jednofázovým základem, v němž mohou být dispergovány tuhé nebo kapalné látky.

Hydrofobní masti

Hydrofobní (lipofilní) masti mohou absorbovat pouze malé množství vody. Typické použité látky jsou tuhý, měkký nebo tekutý parafin, rostlinné oleje, živočišné tuky, syntetické glyceridy, vosky a tekuté polyalkylsiloxany.

Masti emulgující vodu

Vodu emulgující masti mohou absorbovat větší množství vody. Jejich základem jsou takové hydrofobní masti, v nichž jsou přítomny emulgátory typu voda v oleji (*v/o)*, jako jsou vosk z ovčí vlny, alkoholy vosku z ovčí vlny, estery sorbitanu, monoglyceridy a mastné alkoholy.

Hydrofilní masti

Hydrofilní masti jsou přípravky se základem mísícím se s vodou. Základ je obvykle tvořen směsí tekutých a tuhých polyethylenglykolů (makrogolů). Mohou obsahovat přiměřené množství vody.

Cremores
Krémy

Krémy jsou vícefázové přípravky obsahující lipofilní a vodnou fázi.

Hydrofobní krémy

Hydrofobní krémy mají jako kontinuální (vnější) fázi lipofilní fázi. Obsahují emulgátory typu voda v oleji *(v/o)*, jako tuk z ovčí vlny, estery sorbitanu a monoglyceridy.

Hydrofilní krémy

Hydrofilní krémy mají jako kontinuální (vnější) fázi vodnou fázi. Obsahují emulgátory typu olej ve vodě *(o/v)*, jako sodná nebo triethanolamoniová mýdla, sírany mastných alkoholů a polysorbátů, je-li třeba, kombinované s emulgátory typu voda v oleji *(v/o)*.

Gelata
Gely

Gely jsou tvořeny tekutinami, které gelovatí za přítomnosti vhodných gelotvorných látek.

Hydrofobní gely

Hydrofobní gely (oleogely) jsou přípravky, jejichž základ je obvykle tvořen tekutým parafinem s polyethylenem nebo mastnými oleji tvořícími gel s koloidním oxidem křemičitým nebo s hlinitým nebo zinečnatým mýdlem.

Hydrofilní gely

Hydrofilní gely (hydrogely) jsou přípravky, jejichž základ obvykle tvoří voda, glycerol nebo propylenglykol tvořící gel s vhodnou gelotvornou látkou, jako je tragant, škrob, deriváty celulosy, karboxyvinylpolymery a křemičitany hořečnato-hlinité.

Pastae
Pasty

Pasty jsou polotuhé přípravky obsahující v základu vysoký podíl tuhé látky jemně dispergované v základu.

Vaccina ad usum humanum

Vakcíny pro humánní použití

Synonymum. Očkovací látky pro humánní použití

Ustanovení v tomto článku jsou určena pro použití v souvislosti s lékopisnými články na vakcíny pro humánní použití. Tyto požadavky se nevztahují nezbytně na vakcíny, které nejsou předmětem těchto článků.

Jsou to přípravky obsahující antigenní látky schopné vyvolat specifickou aktivní imunitu proti infekčnímu agens nebo jím vytvořenému toxinu či antigenu. Mělo by být prokázáno, že jsou účinné u lidí.

Mohou obsahovat buď inaktivované patogenní organismy, nebo živé organismy přiměřeně ošetřené, pokud bylo třeba oslabit jejich virulenci bez poškození antigenní účinnosti, nebo mohou obsahovat antigenní frakce nebo látky vytvořené těmito patogenními organismy, které byly zneškodněny, zatímco jejich antigenní vlastnosti zůstaly zachovány.

Výroba

Metody přípravy se liší podle typu vakcíny tak, jak je popsáno níže nebo v jednotlivých článcích, a jsou zaměřeny tak, aby byly zachovány příslušné antigenní vlastnosti a zabezpečeno co nejlépe, že nedojde ke kontaminaci cizorodými antigeny.

Během přípravy mohou být přidány vhodné přísady včetně adjuvancií, penicilin se však nepoužije v žádném stupni přípravy ani se nepřidá ke konečnému výrobku. Kromě případů, kdy je to uvedeno v článku, se při přípravě nepoužije streptomycin. Tam, kde je povoleno jeho přidání do buněčných kultur, které se mají použít při výrobě virových vakcín, není prokazatelný při inokulaci kultur virem. Ke sterilním a inaktivovaným přípravkům je možno přidat vhodnou protimikrobní konzervační látku a přidává se vždy, jsou-li přípravky dodávány v mnohodávkových obalech, pokud není v článku předepsáno jinak. Konečný výrobek se asepticky plní do sterilních a zabezpečených obalů, které se pak uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace.

Vakcíny mohou být adsorbované na hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, fosforečnan vápenatý nebo jiný sorbent předepsaný v článku. Sorbenty se připravují ve specifických podmínkách, ve kterých se vytvoří vhodná fyzikální forma a adsorpční vlastnosti. Adsorbované přípravky obsahují nejvýše 1,25 mg hliníku (Al) *(2.5.13)* nebo nejvýše 1,3 mg vápníku (Ca) *(2.5.14)* v jedné lidské dávce, není-li v článku předepsáno jinak.

Pro lyofilizované vakcíny se používá takové metody lyofilizace, aby se snížil obsah vody na nejvýše 2,0 %, není-li v článku uvedeno jinak.

Pokud byl při výrobě použit fenol, je jeho koncentrace v konečném výrobku nejvýše 2,5 g/l *(2.5.15)*, není-li v článku uvedeno jinak.

Pokud byl při výrobě použit formaldehyd, je koncentrace volného formaldehydu v konečném výrobku nejvýše 0,2 g/l *(2.4.18)*.

Bakteriální vakcíny

Bakteriální vakcíny se připravují z kultur vhodných kmenů kultivovaných na pevných nebo v tekutých živných půdách a obsahují inaktivované nebo živé bakterie nebo jejich antigenní složky. Jsou to suspenze s různým stupněm zákalu v bezbarvých nebo téměř bezbarvých tekutinách nebo mohou být lyofilizovány.

K přípravě může být použita celá kultura nebo mikroorganismy nebo jejich části. Bakteriální vakcíny obsahující inaktivované organismy mohou být připraveny chemickými nebo fyzikálními postupy bez porušení jejich imunizačních vlastností. Bakteriální vakcíny obsahující živé bakterie se připravují z oslabených kmenů schopných navodit imunitu proti patogenním kmenům stejného druhu nebo antigenně příbuzných druhů. Koncentrace živých nebo inaktivovaných bakterií se vyjadřuje v mezinárodních zákalových jednotkách nebo, je-li to vhodné, se stanoví přímým spočítáním buněk nebo u živých bakterií stanovením počtu životaschopných zárodků.

Bakteriální toxoidy

Bakteriální toxoidy se připravují z toxinů snížením jejich toxicity na nedetekovatelnou úroveň nebo úplným odstraněním toxicity fyzikálními nebo chemickými postupy bez zničení jejich imunizačních vlastností. Postup přípravy je takový, aby se toxoid nezměnil zpět na toxin.

Toxiny se získávají z vybraných kmenů specifických mikroorganismů rostoucích na půdách neobsahujících podle možnosti složky, o nichž je známo, že vyvolávají toxické, alergické nebo jiné nežádoucí reakce u lidí. Toxoidy mohou být tekuté nebo lyofilizované. Mohou být čištěné a adsorbované.

Adsorbované toxoidy jsou suspenze bílých nebo šedých částic rozptýlených v bezbarvých nebo slabě žlutých tekutinách a mohou tvořit sediment na dně nádoby.

Virové vakcíny

Virové vakcíny se připravují za použití systému jednotné inokulace z virů vypěstovaných na zvířatech, ptačích embryích, ve vhodných buněčných kulturách nebo na vhodných tkáních. Virové vakcíny jsou suspenze živých nebo inaktivovaných virů nebo jejich částí. Živé vakcíny se obvykle připravují za použití oslabených kmenů. Inaktivované vakcíny se mohou připravit vhodnými chemickými nebo fyzikálními postupy.

Zákal virových vakcín se může lišit podle způsobu jejich přípravy. Mohou být zabarvené, obsahují-li indikátor pH, jako např. fenolovou červeň.

Uchovávání

Vakcíny se chrání před světlem, a není-li v článku předepsáno jinak, skladují se při (5 ± 3) °C. Tekuté a adsorbované vakcíny se chrání před mrazem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název přípravku,
- číslo výrobní šarže nebo jiný údaj,
- doporučená humánní dávka a způsob podání,
- podmínky uchovávání,
- doba použitelnosti, u nádob menších než 1 ml, které jsou baleny jednotlivě, může být doba použitelnosti vynechána v označení vnitřního obalu za předpokladu, že je uvedena na vnějším obalu a zde je uveden požadavek, aby nádoba byla uložena ve vnějším obalu až do použití,

- název a množství protimikrobní konzervační látky nebo jiné látky přidané do vakcíny,
- název jakékoliv složky, která může způsobit nežádoucí reakce a jakékoliv kontraindikace použití vakcíny, pokud není tato závažná informace uvedena na příbalovém letáku vloženém do vnějšího obalu,
- *u lyofilizovaných vakcín*:
  - název nebo složení a objem přiložené tekutiny k rekonstituci,
  - že vakcína má být podána ihned po rekonstituci,
- název a adresa výrobce.

Vaccina ad usum veterinarium

Vakcíny pro veterinární použití

Synonymum. Veterinární očkovací látky

Ustanovení v tomto článku se používají v lékopisných článcích na vakcíny pro veterinární použití. Nevztahují se nezbytně na vakcíny pro veterinární užití, které nejsou předmětem těchto článků. V případě složených vakcín se ke každé složce, která je předmětem lékopisného článku, vztahují opatření tohoto článku přizpůsobená dle potřeby, jak je popsáno níže, viz Zkoušky na čistotu (Bezpečnost), Hodnocení bezpečnosti veterinárních vakcín (5.2.6) a Hodnocení účinnosti veterinárních vakcín (5.2.7).

Vakcíny pro veterinární použití jsou přípravky obsahující antigenní látky a podávají se k vyvolání specifické a aktivní imunity proti onemocněním vyvolaným bakteriemi, toxiny, viry nebo parazity. Živé nebo inaktivované vakcíny vyvolávají aktivní imunitu, která může být pasivně přenesena mateřskými protilátkami proti imunogenům, jež vakcíny obsahují, a někdy též proti antigenně příbuzným organismům. Vakcíny mohou obsahovat živé nebo inaktivované mikroorganismy, parazity nebo antigenní frakce či látky vytvářené těmito organismy. Jsou neškodné, přitom si uchovávají všechny nebo alespoň část svých antigenních vlastností. Vakcíny mohou také obsahovat kombinace těchto složek. Ke zvýšení imunizačních vlastností vakcíny se mohou použít vhodná adjuvancia. Terminologie užívaná v článcích na vakcíny pro veterinární použití je uvedena v obecné stati (*5.2.1*).

Bakteriální vakcíny a bakteriální toxoidy

Bakteriální vakcíny a bakteriální toxoidy se připravují z kultur vypěstovaných na vhodných pevných nebo tekutých živných půdách či jiným vhodným způsobem.

Požadavky uvedené v této části se nevztahují na bakteriální vakcíny připravené na buněčných kulturách nebo živých zvířatech. Použitý kmen bakterií mohl být změněn genetickým inženýrstvím. U každé použité bakteriální kultury je pečlivě kontrolována totožnost, antigenní účinnost a čistota. Bakteriální vakcíny obsahují inaktivované nebo živé bakterie nebo jejich antigenní části. Tyto přípravky jsou buď tekuté o různém stupni zákalu, nebo mohou být lyofilizovány.

Bakteriální toxoidy se připravují z toxinů snížením jejich toxicity na velmi nízkou úroveň nebo úplným odstraněním toxicity fyzikálními či chemickými prostředky při zachování odpovídající imunizační účinnosti. Toxiny se získávají z vybraných kmenů specifikovaných mikroorganismů, které vyrostly na vhodných živných půdách, nebo se získávají jinými vhodnými prostředky, například chemickou syntézou.

Toxoidy mohou být:
- tekuté,
- vysrážené síranem draselno-hlinitým nebo jiným vhodným činidlem,
- purifikované nebo též adsorbované na fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý, fosforečnan vápenatý nebo jiná adsorbencia uvedená v příslušném článku.

Bakteriální toxoidy jsou čiré nebo lehce opalizující tekutiny. Adsorbované toxoidy jsou suspenze nebo emulze. Některé toxoidy mohou být lyofilizované. Pokud není uvedeno jinak, vztahují se ustanovení a požadavky dále uvedené stejně na bakteriální vakcíny, na bakteriální toxoidy a na přípravky obsahující kombinaci bakteriálních buněk a toxoidů.

Virové vakcíny

Virové vakcíny se připravují kultivací na vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*), tkáních, mikroorganismech, ptačích embryích nebo (pokud není možné jinak) živých zvířatech nebo jinými vhodnými prostředky. Použitý kmen viru mohl být změněn genetickým inženýrstvím. Jsou to tekuté nebo lyofilizované přípravky jednoho nebo více virů, virových subjednotek nebo peptidů.

Živé virové vakcíny se připravují z virů, které mají oslabenou virulenci nebo mají přirozeně nízkou virulenci pro cílový druh.

Inaktivované virové vakcíny se zpracovávají validovaným postupem inaktivace viru a mohou být purifikovány a koncentrovány.

Vektorové vakcíny

Vektorové vakcíny jsou tekuté nebo lyofilizované přípravky, které obsahují jeden nebo více typů živých mikroorganismů (bakterií nebo virů), které nejsou patogenní nebo mají nízkou patogenitu pro cílový druh a do kterých byl vložen jeden nebo více genů kódujících antigeny, které stimulují imunitní ochrannou odpověď proti jiným mikroorganismům.

Výroba

Metody přípravy, které se liší podle typu vakcíny, jsou voleny tak, aby se zachovala totožnost a imunogenita antigenu a aby se zabránilo kontaminaci cizími agens.

Látky živočišného původu užité při výrobě vakcín pro veterinární použití vyhovují požadavkům obecné stati (*5.2.5*). Jiné látky použité ve výrobě vakcín pro veterinární použití vyhovují požadavkům lékopisu (pokud existuje odpovídající článek) a připravují se způsobem, který zabraňuje kontaminaci vakcíny živými organismy nebo toxiny.

Substráty pro výrobu

Buněčné kultury použité k výrobě vakcín pro veterinární použití vyhovují požadavkům obecné stati (*5.2.4*). Kde článek odkazuje na chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů (SPF), tyto chovy vyhovují požadavkům, které jsou popsány v obecné stati "Chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů, která jsou určena pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín" (*5.2.2*).

Pro výrobu inaktivovaných vakcín, kde organismy vakcíny jsou kultivovány v embryích, tato embrya pocházejí buď z SPF chovu (*5.2.2*), nebo ze zdravého ne-SPF chovu bez přítomnosti určitých agens a jejich protilátek, jak je specifikováno v příslušném článku. Může být nutné prokázat účinnost postupu inaktivace proti specifikovaným možným kontaminantám. Ve výrobě matečného inokula a ve všech pasážích mikroorganismů k přípravě pracovního inokula se používají embrya z SPF chovů (*5.2.2*).

Pokud je ve výrobě vakcín pro veterinární použití nevyhnutelné použít zvířata nebo zvířecí tkáně, musí být tato zvířata prostá specifikovaných patogenů z hlediska použitého druhu těchto zvířat a cílového zvířete pro vakcínu.

Tkáňová média

Zaznamená se alespoň kvalitativní složení média použitého pro přípravu výchozí kultury a pro výrobu. Jakost všech uvedených složek je specifikována. Pokud jsou média nebo jejich složky označeny jako výrobní vlastnictví, je to uvedeno a je zaznamenán vhodný popis. Složky živočišného původu jsou specifikovány zdrojem živočišného druhu a zemí původu a vyhovují požadavkům obecné stati (*5.2.5*). Použitý postup přípravy médií, včetně sterilizačních postupů, je dokumentován.

Přidání antibiotik při výrobním postupu je normálně omezeno na tekutiny buněčných kultur a jiná média, na inokulum kuřecích embryí, materiál získaný z kůže nebo jiných tkání.

Bakteriální zásobní inokulum

Všeobecné požadavky. Je stanoven rod a druh, a pokud je to možné, též kmen bakterií, které jsou určeny k výrobě vakcíny. Pokud je to možné, je používán systém jednotné inokulace. Každé matečné inokulum se zkouší, jak je popsáno dále. Pro každé matečné inokulum se vedou tyto údaje: původ, datum izolace, průběh pasážování (včetně čištění a charakterizačních postupů) a podmínky uchovávání. Každé matečné inokulum má přidělen specifický kód k identifikačním účelům.

Pomnožování. Před zahájením výroby je stanoven minimální a maximální počet subkultur každého matečného inokula. Dále se dokumentují metody pro přípravu očkovacích kultur a přípravu suspenze pro očkování, technika inokulace násady, titr a koncentrace použitého inokula a použitá média. Mělo by být dokázáno, že se těmito subkulturami nemění charakteristické znaky kultury (např. disociace, antigenita). Jsou zdokumentovány podmínky, za kterých je každé zásobní inokulum uchováváno.

Totožnost a čistota. Každé matečné inokulum průkazně obsahuje pouze uvedený bakteriální druh a kmen. Zaznamená se krátký popis metod k prokázání totožnosti každého kmene biochemickými, sérologickými a morfologickými charakteristikami a co možná největší rozlišení od příbuzných kmenů a také metody ke zjištění čistoty kmene. Jestliže se prokáže, že matečné inokulum obsahuje nějaké jiné živé organismy, než je uvedený druh a kmen, je toto inokulum nevhodné pro výrobu vakcíny.

Virové zásobní inokulum

Všeobecné požadavky. U virů používaných ve výrobě je zaveden systém jednotné inokulace. Každé matečné inokulum se zkouší, jak je popsáno dále. O každém matečném inokulu se vedou tyto údaje: původ, datum izolace, průběh pasážování, včetně čištění a charakterizačních postupů, a podmínky uchovávání. Každé matečné inokulum má přidělen specifický kód k identifikačním účelům. K výrobě vakcíny se obvykle používá virus po nejvýše pěti pasážích z matečného inokula. Ve zkouškách matečného inokula dále popsaných, pokud není uvedeno jinak, se obvykle na počátku zkoušky použijí organismy po nejvýše pěti pasážích z matečného inokula.

Tam, kde je matečné inokulum obsaženo v permanentně infikovaných matečných buňkách, provádí se další zkoušky na vhodném objemu viru z rozrušených matečných buněk. Kde se provedly odpovídající zkoušky na rozrušených buňkách k validaci vhodnosti matečných tkáňových buněk, nemusí se tyto zkoušky opakovat.

Pomnožování. Matečné inokulum a všechny následující pasáže se naočkují do buněk, embryí nebo do zvířat, u nichž bylo prokázáno, že jsou vhodné pro výrobu vakcín (viz výše). Použijí-li se látky živočišného původu, vyhovují požadavkům obecné stati (*5.2.5*).

Totožnost. Použijí se vhodné metody k prokázání totožnosti vakcinačního kmene a jeho co největšího rozlišení od příbuzných kmenů.

Bakterie a houby. Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Mykoplazmata (*2.6.7*). Matečné inokulum vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Nepřítomnost cizích virů. Příprava monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, obsahujících vysokou hladinu neutralizačních protilátek proti viru zásobního inokula, se provádí po šaržích za použití antigenu, který není získán z jakékoli úrovně pasáže izolace viru, z níž bylo připraveno matečné inokulum. Každá šarže séra se 30 min zahřívá na 56 °C, aby se inaktivoval komplement. U každé šarže se prokáže, že neobsahuje protilátky na možnou kontaminaci virové kultury a že nemá žádné nespecifické inhibující účinky na schopnost viru infikovat a dále se množit v buňkách (nebo embryích, pokud je to vhodné). Pokud se takové sérum nemůže získat, použijí se jiné specifické metody k odstranění nebo neutralizaci virového inokula.

Použitím minimálního množství monoklonální nebo polyklonální protilátky se vzorek matečného inokula ošetří tak, že virus vakcíny je neutralizován tak dalece, jak je možné, nebo je odstraněn. Konečná směs virus-sérum by měla, pokud je to možné, obsahovat titr viru odpovídající nejméně deseti dávkám vakcíny v 0,1 ml u aviárních vakcín a v 1 ml u ostatních vakcín. Tato směs se zkouší na nepřítomnost cizích virů, jak je popsáno dále.

Pro aviární vakcíny se provede zkouška na cizí viry s použitím embryí (*2.6.3*), zkouška na viry leukózy (*2.6.4*), důkaz cizích virů zkouškou na buněčných kulturách (*2.6.5*) a důkaz cizích antigenů zkouškou na kuřatech (*2.6.6*).

Pro ostatní vakcíny se směs naočkuje do kultur požadovaného typu buněk na plochu nejméně 70 cm^2. Kultury mohou být očkovány v jakémkoli stupni růstu až do 70% nárůstu. Nejméně jeden monolayer se uchová jako kontrolní. Kultury se denně prohlížejí po dobu jednoho týdne. Na konci tohoto období se kultury třikrát zmrazí a opět rozmrazí, odstředí, aby se odstranily odumřelé buňky, a přeočkují se do stejného typu buněk, jak je uvedeno výše. Tento postup se dvakrát opakuje. K provedení dalších zkoušek se v konečné pasáži získá dostatečné množství buněk ve vhodných nádobách.

Cytopatická a hemadsorpční agens se zkoušejí metodami popsanými v obecné stati o zkoušení buněčných kultur (*5.2.4*). Metody, jako je imunofluorescence, se použijí k důkazu specifické kontaminace pro zkoušky v buněčných kulturách. Matečné inokulum se naočkuje do:
- primárních buněk druhu, z něhož virus pochází,
- buněk citlivých na virus, patogenní pro druh, pro který je určena vakcína,
- buněk citlivých na pestiviry.

Jestliže se prokáže, že matečné inokulum obsahuje nějaké jiné živé organismy, než je uvedený druh a kmen, nebo cizorodé virové antigeny, je toto inokulum nevhodné pro výrobu vakcíny.

Inaktivace

Inaktivované vakcíny se podrobují validaci inaktivačního postupu. Dále popsané zkoušení inaktivační kinetiky se provádí jednou pro daný výrobní postup. Zbytek tohoto oddílu se vztahuje ke každé výrobě. Při provádění zkoušek na inaktivaci je nutno si uvědomit, že ve výrobních podmínkách mohou být organismy fyzikálně chráněny před inaktivační látkou.

Inaktivační kinetika. Mělo by se prokázat, že ve výrobních podmínkách inaktivační agens a inaktivační postup inaktivují mikroorganismus vakcíny. O inaktivační kinetice by se měly získat náležité údaje. Obvykle by čas potřebný k inaktivaci neměl být delší než 67 % trvání celého inaktivačního postupu.

Aziridin. Jestliže se jako inaktivační agens použije nějaká sloučenina aziridinu, mělo by se prokázat, že na konci inaktivačního postupu nezůstane žádné inaktivační agens. Toho se může dosáhnout neutralizací inaktivačního agens thiosulfatem a průkazem reziduálního thiosulfatu v inaktivované sklizni na konci inaktivačního postupu.

Formaldehyd. Jestliže se jako inaktivační agens použije formaldehyd, pak se provede zkouška na volný formaldehyd, jak je předepsáno ve zkouškách na čistotu.

Ostatní inaktivační agens. Když se použijí jiné metody inaktivace, provedou se patřičné zkoušky, aby se prokázalo, že inaktivační agens bylo odstraněno nebo sníženo na přijatelnou úroveň reziduí.

Zkoušení inaktivace. Zkouška na plnou inaktivaci se provádí ihned po ukončení inaktivačního postupu. Pokud je to nutné, provádí se také neutralizace nebo odstranění inaktivačního agens. Obsahuje-li vakcína adjuvans, které znemožňuje provést zkoušku na inaktivaci v konečné šarži, provede se místo šaržové zkoušky mezioperační zkouška na inaktivaci se směsí antigenů bezprostředně před přidáním adjuvans.

a) Bakteriální vakcíny. Vybraná zkouška bude vhodná pro použité vakcinační bakterie a bude sestávat nejméně ze dvou pasáží v produkční živné půdě. Pokud byla k výrobě použita pevná živná půda, je vhodné použít tekutou půdu nebo jinou půdu předepsanou ve specifickém článku. Přípravek vyhovuje, jestliže nebyl nalezen žádný živý mikroorganismus.

b) Bakteriální toxoidy. Zkouška na detoxikaci by se měla provést ihned po výrobě toxoidu a případně po neutralizaci nebo odstranění inaktivačního agens. Vybraná zkouška bude vhodná pro přítomný toxin nebo toxiny a bude z dostupných zkoušek nejcitlivější. Pokud je riziko, že se navrátí toxicita, provede se další zkouška v konečné části výroby, ve které citlivost zkoušky nemůže být zpochybněna.

c) Virové vakcíny. Vybraná zkouška vhodná pro použitý vakcinační virus bude sestávat nejméně ze dvou pasáží na buňkách, kuřecích embryích nebo, pokud není k dispozici jiná vhodná citlivá metoda, na zvířatech. Počet buněk, kuřecích embryí nebo zvířat bude dostatečný k zajištění požadované citlivosti zkoušky. Pro zkoušky v buněčných kulturách se nejméně 150 cm^2 buněčného monolayeru inokuluje 1,0 ml inaktivované sklizně. Přípravek vyhovuje, jestliže nebyl nalezen žádný živý virus nebo jiný mikroorganismus.

Výběr složení vakcíny a výběr vakcinačního kmene

Pro výběr složení vakcíny a výběr vakcinačního kmene je důležitá zejména bezpečnost, účinnost a stabilita. Všeobecné požadavky na hodnocení bezpečnosti a účinnosti jsou uvedeny v části Hodnocení bezpečnosti veterinárních vakcín (*5.2.6*) a v části Hodnocení účinnosti veterinárních vakcín (*5.2.7*). Tyto požadavky mohou být více upřesněny v odpovídajících článcích.

Důkaz stability se získává prokázáním navržené doby použitelnosti. Těmito důkazy se rozumějí výsledky titrací virů, počtu bakterií nebo zkoušek účinnosti prováděných v pravidelných intervalech až do doby tří měsíců po době použitelnosti nejméně na třech reprezentativních, po sobě vyrobených šaržích skladovaných v doporučených skladovacích podmínkách. Dále se případně berou v úvahu výsledky stanovení vlhkosti (lyofilizované přípravky), fyzikální zkoušky adjuvans, chemické zkoušky takových látek, jako jsou např. pomocné konstituens a konzervancia, a hodnota pH. Kde je to vhodné, provádí se stabilitní studie rekonstituované vakcíny, při níž se použije přípravek rozpuštěný podle navrženého doporučení.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny je připravena kombinací jedné nebo více šarží antigenu, který vyhověl příslušným zkouškám, a dalších pomocných látek - adjuvans, stabilizátorů, protimikrobních konzervačních látek a rozpouštědel.

Protimikrobní konzervační látky. Protimikrobní konzervační látky slouží k prevenci znehodnocení nebo k prevenci nežádoucích účinků způsobených mikrobiální kontaminací během používání vakcín. Nejsou obsaženy v lyofilizovaných produktech, ale je-li to oprávněno, vzhledem k maximální doporučené době použití po rekonstituci, mohou být součástí rozpouštědel pro vícedávkové

lyofilizované přípravky. V jednodávkových tekutých přípravcích není obecně přítomnost protimikrobních konzervačních látek přijatelná, ale může být přijatelná, když se např. jedna vakcína plní do jednodávkových i vícedávkových obalů. Ve vícedávkových tekutých přípravcích se hodnotí potřeba účinné protimikrobní konzervace vzhledem k pravděpodobné kontaminaci během používání a maximální doporučené době použití po probodnutí obalu. Obsahuje-li vakcína takovouto látku, měla by být dokázána její účinnost po dobu použitelnosti. Obsah protimikrobní konzervační látky v konečné várce vakcíny se v každé šarži stanoví vhodnou metodou. Obsahuje nejméně 85 % a nejvýše 115 % zamýšleného množství.

Použití antibiotik jako protimikrobních konzervačních látek není přijatelné.

V inaktivovaných vakcínách, kde by mohly pomocné složky interferovat ve zkoušce inaktivace, se tato zkouška provede při výrobě konečné várky vakcíny po kombinaci různých šarží antigenů, ale před přidáním jakékoli pomocné látky. Potom se mohou zkoušky inaktivace u konečné várky a šarže vynechat. Určité zkoušky se mohou spíše provádět v konečné várce vakcíny než na šarži nebo šaržích z ní připravených. Jsou to zkoušky na protimikrobní konzervační látky, na volný formaldehyd, na bezpečnost a účinnost inaktivovaných vakcín.

Šarže

Pokud není v článku uvedeno jinak, plní se konečná várka asepticky do sterilních zabezpečených obalů, které se potom uzavírají tak, aby se vyloučila kontaminace.

Fyzikální zkoušky. Vakcína obsahující olejové adjuvans se zkouší vhodnou metodou na viskozitu a výsledky jsou v rozmezí určeném pro přípravek. Prokáže se stabilita emulze.

Chemické zkoušky. Provede se stanovení koncentrace takových složek, jako je hliník a protimikrobní konzervační látky, aby se prokázalo, že jsou v rozmezí určeném pro výrobek.

Hodnota pH. U tekutých přípravků a rozpouštědel se stanoví hodnota pH a prokáže se, že je v rozmezí určeném pro přípravek.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Kde je to vhodné, stanoví se u lyofilizovaných přípravků obsah vody a prokáže se, že je v rozmezí určeném pro přípravek.

Pouze ta šarže, která vyhověla všem požadavkům níže uvedených zkoušek totožnosti, zkoušek na čistotu a stanovení účinnosti nebo též požadavkům jednotlivých lékopisných článků, může být uvolněna k použití. Se souhlasem oprávněné autority mohou být vynechány určité zkoušky šarže, jestliže mezioperační zkoušky dávají stejnou nebo lepší záruku, že šarže vyhovuje, nebo byly provedeny alternativní zkoušky validované podle metod lékopisu.

Zkoušky na čistotu

Jednotlivé články rovněž určují zkoušky, které mají být provedeny u každé jednotlivé vakcíny.

Formaldehyd (*2.4.18*). Použije se metoda B, jestliže byl použit disiřičitan sodný k neutralizaci přebytečného formaldehydu.) Jestliže byl při výrobě použit formaldehyd, není obsah volného formaldehydu vyšší než 0,5 g/l, pokud nebyla prokázána bezpečnost vyšší koncentrace.

Fenol (*2.5.15*). Pokud vakcína obsahuje fenol, není jeho obsah vyšší než 5 g/l.

Sterilita (*2.6.1*). Předepisuje-li to článek, jsou vakcíny sterilní. Je-li objem tekutiny v obalu vyšší než 100 ml, měla by se dle možnosti použít metoda membránových filtrů. Nemůže-li se metoda membránových filtrů použít, provede se metoda přímého očkování. Pokud je objem každého obalu 20 ml nebo více, je nejmenší množství použité do každé živné půdy 10 % obsahu nebo 5 ml, podle toho, co je méně.

Přiměřené množství vzorků (*2.6.1*) ke zkoušení je 1 % ze šarže - nejméně čtyři a nejvíce deset.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Předepisuje-li to článek, vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata. V závislosti na původu buněk užitých k výrobě, složení kultivačního média a na cílovém druhu se provede zkouška na aviární mykoplazmata nebo zkouška na neaviární mykoplazmata a ureoplazmata nebo obojí.

Bezpečnost. Všeobecně se vstřikují doporučeným způsobem dvě dávky inaktivované vakcíny a nebo deset dávek živé vakcíny. Pro složené vakcíny, pokud to popis povoluje, se může zkouška provést s oddělenými složkami. Není-li to možné, bude nutné pro účely zkoušky snížit předepsaný počet dávek živé vakcíny, pokud by vstříknutí deseti dávek znamenalo podání neúnosně vysokého počtu inaktivovaných složek. Zvířata se pozorují po nejdelší dobu uvedenou ve specifickém článku. Nejsou pozorovány žádné abnormální lokální či systémové reakce.

Uchovávání

Chráněny před světlem, při teplotě (5 ± 3) °C, pokud není v článku stanoveno jinak. Pokud není uvedeno jinak, není povoleno zmrazit tekuté preparáty.

Doba použitelnosti. Počítá se od zahájení zkoušky účinnosti nebo stanovení titru viru nebo stanovení počtu živých bakterií. Vztahuje se na vakcíny uchovávané v předepsaných podmínkách.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- že přípravek je určen pro veterinární použití,
- objem přípravku a počet dávek v obalu,
- způsob podání,
- použitý typ nebo typy bakterií či virů a u živých vakcín nejnižší počet živých bakterií nebo nejnižší titr viru,
- kde je to vhodné, u inaktivovaných vakcín minimální účinnost v mezinárodních jednotkách,
- kde je to vhodné, název a množství použité protimikrobní konzervační látky nebo jiné látky přidané do vakcíny,
- název každé přidané látky, která může způsobit vedlejší reakce,
- *u lyofilizovaných vakcín:*
  - název či složení a objem tekutiny k rekonstituci, která se má přidat,
  - doba, za kterou je nutno spotřebovat vakcínu po rekonstituci,
- u vakcín s olejovým adjuvans uvést, že pokud se vakcína náhodou vstříkne člověku, je nutné ihned vyhledat lékaře,
- živočišný druh, pro který je vakcína určena,
- indikace vakcíny,
- návod k použití,
- doporučené dávky pro různé druhy zvířat.

Vaginalia

Vaginální přípravky

Jsou to tekuté, polotuhé nebo tuhé přípravky určené k aplikaci do pochvy zpravidla k místnímu účinku. Obsahují jednu nebo více léčivých látek ve vhodném základu.

Obaly pro vaginální přípravky, kde je to vhodné, vyhovují požadavkům statí Materiály používané na výrobu obalů (*3.1* a příslušné části) a Obaly (*3.2* a příslušné části).

Rozlišuje se několik druhů vaginálních přípravků:
- vaginální kuličky,
- vaginální tablety,
- vaginální tobolky,
- vaginální pěny,
- vaginální tampony s léčivy.

Výroba

Při výrobě, balení, uchovávání a distribuci vaginálních přípravků se používá vhodných způsobů k zajištění jejich mikrobiální čistoty; příslušná doporučení jsou ve stati Mikrobiologická jakost léčivých přípravků (*5.1.4*).

Zkoušení

Obsahová stejnoměrnost *(2.9.6)*. Není-li předepsáno a schváleno jinak, pevné a tuhé jednodávkové přípravky s obsahem účinné látky menším než 2 mg nebo nižším než 2 % celkové hmotnosti vyhovují zkoušce A (vaginální tablety) nebo zkoušce B (vaginální kuličky, vaginální tobolky) na obsahovou stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Obsahuje-li přípravek více účinných látek, požadavky zkoušky se vztahují jen na ty látky, které odpovídají výše uvedeným podmínkám.

Hmotnostní stejnoměrnost *(2.9.5)*. Pevné a tuhé jednodávkové přípravky vyhovují zkoušce na hmotnostní stejnoměrnost jednodávkových lékových forem. Je-li zkouška na obsahovou stejnoměrnost předepsána pro všechny obsažené účinné látky, neprovádí se zkouška na hmotnostní stejnoměrnost.

Disoluce. Použije se vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování léčivé látky (látek) z pevného nebo tuhého jednodávkového přípravku, např. jedna ze zkoušek uvedených ve stati Zkouška disoluce pevných jednodávkových lékových forem *(2.9.3)*.

Provádí-li se zkouška disoluce, neprovádí se zkouška rozpadavosti.

Globuli vaginales

Vaginální kuličky

Synonyma. Globuli, Suppositoria vaginalia, poševní kuličky

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky různého tvaru, obvykle vejčitého. Mají objem a konzistenci vhodné k aplikaci do pochvy. Kromě tvaru odpovídají definici čípků uvedené v článku *Rectalia*.

Vaginální kuličky jsou připravovány za použití postupů a pomocných látek uvedených u čípků v článku *Rectalia*. Léčivá látka (látky) je dispergována nebo rozpuštěna v jednoduchém nebo slože-

ném základu, který může být rozpustný nebo nerozpustný, ale tající při teplotě těla nebo dispergovatelný ve vodě.

Vaginální přípravky, které odpovídají definici vaginálních kuliček, lze připravovat lisováním. Přípravek vyhovuje požadavkům na vaginální kuličky.

Výroba

Použije se vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování účinné látky (látek) z přípravku s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují Zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků *(2.9.2)*. Hodnotí se stav vaginálních kuliček po 60 min, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Uchovávání

V dobře uzavřených obalech.

Tabulettae vaginales

Vaginální tablety

Jsou to pevné jednodávkové přípravky. Obvykle odpovídají definici neobalených nebo potahovaných tablet uvedené v článku *Tabulettae*.

Výroba

Použije se vhodná zkouška k ověření vhodného uvolňování účinné látky (látek) z přípravku s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují Zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků (*2.9.2*). Hodnotí se stav vaginálních tablet po 30 min, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Capsulae vaginales

Vaginální tobolky

Synonymum. Vaginální kapsle

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky. Jsou podobné měkkým tobolkám, od nichž se liší velikostí a tvarem. Vaginální tobolky mají různý tvar, nejčastěji vejčitý. Vaginální tobolky jsou hladké a přípravek má jednotný vzhled.

Výroba

Použije se vhodná zkouška k ověření příslušného uvolňování účinné látky (látek) z přípravku s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem.

Zkoušení

Zkouška rozpadavosti. Pokud se nejedná o přípravky s řízeným uvolňováním nebo prodlouženým místním účinkem, vyhovují Zkoušce rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků (*2.9.2*). Hodnotí se stav vaginálních tobolek po 30 min, pokud není předepsáno a schváleno jinak.

Spumae vaginales

Vaginální pěny

Synonymum. Musci vaginales

Vyhovují požadavkům článku *Spumae medicatae*.

Tampona vaginala medicata

Vaginální tampony s léčivy

Jsou to tuhé jednodávkové přípravky určené k zavedení do pochvy na určenou dobu.
Vyhovují požadavkům článku *Tampona medicata*.

6.2.2 Jednotlivé léčivé přípravky

Albumini humani solutio

Roztok lidského albuminu

Je to vodný roztok bílkovin získaných z plazmy, která vyhovuje požadavkům uvedeným v článku *Plasma humanum ad separationem.*

Výroba

Separace albuminu se provádí v řízených podmínkách, zejména v hodnotě pH, iontové síle a teplotě tak, aby v konečném výrobku bylo z celkové bílkoviny nejméně 95 % albuminu. Roztok lidského albuminu se připravuje jako koncentrovaný roztok obsahující 150 g/l až 250 g/l celkové bílkoviny nebo jako izotonický roztok obsahující 35 g/l až 50 g/l celkové bílkoviny. Může se přidat vhodný stabilizátor proti vlivům tepla, jako je sodná sůl kyseliny kaprylové (sodná sůl kyseliny oktanové) nebo N-acetyltryptofan nebo jejich kombinace ve vhodné koncentraci, ale v žádném stupni během přípravy se nepřidává žádná protimikrobní konzervační látka. Roztok se filtruje přes bakteriální filtr a rozplňuje se asepticky do sterilních obalů, které se pak uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. Roztok se v konečném obalu zahřívá nejméně 10 h při (60 ± 0,5) C. Obaly se potom inkubují nejméně 14 dní při 30 C až 32 C nebo nejméně 4 týdny při 20 C až 25 C a vizuálně se vyšetřují na známky mikrobiálního znečištění.

Vlastnosti

Čirá slabě viskózní tekutina; téměř bezbarvá, žlutá nebo zelená.

Zkoušky totožnosti

A. Za použití vhodných řad druhově specifických antisér se provedou se zkoušeným přípravkem precipitační zkoušky. Doporučuje se provést zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných k přípravě látek biologického původu v příslušné zemi. Prokáže se, že přípravek obsahuje bílkoviny lidského původu a dává negativní výsledky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

B. Zkouší se vhodnou imunoelektroforetickou technikou. Použije se sérum proti normálnímu lidskému séru. Porovná se normální lidské sérum a zkoušený přípravek. Oba vzorky se zředí tak, aby obsahovaly 10 g bílkoviny v litru. Hlavní složka zkoušeného vzorku odpovídá hlavní složce normálního lidského séra. Přípravek může obsahovat malá množství jiných plazmatických bílkovin.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,7 až 7,3. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby výsledný roztok obsahoval 10 g bílkoviny v litru.

Celková bílkovina. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby výsledný roztok obsahoval asi 15 mg bílkoviny ve 2 ml. Ke 2,0 ml tohoto roztoku v centrifugačních zkumavkách s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové prosté dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se a 5 min se odstřeďuje, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkoviny se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25. Přípravek obsahuje nejméně 95 % a nejvýše 105 % množství bílkoviny uvedeného v označení.

Bílkovinné složení. Stanoví se zónovou elektroforézou (*2.2.31*) za použití proužků gelu vhodného acetatu celulosy jako nosiče a *tlumivého roztoku barbitalového o pH 8,6* jako roztoku elektrolytu.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci bílkoviny 20 g/l.
Porovnávací roztok. Albumin lidský pro elektroforézu BRP se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci bílkoviny 20 g/l.

Na proužek gelu se nanese 2,5 µl zkoušeného roztoku do pruhu 10 mm nebo se nanese 0,25 µl/mm, jestliže se použije úzký proužek. Na další proužek se nanese stejným způsobem stejný objem porovnávacího roztoku. Použije se vhodné elektrické pole, aby se nejrychlejší pruh posunul nejméně 30 mm. Na proužky se 5 min působí *černí amido 10B RS*. Odbarvuje se směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *methanolu R* (10 + 90) do odbarvení pozadí. Proužky se zprůhlední směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *methanolu R* (19 + 81). Absorbance pásů se měří při 600 nm pomocí zařízení, které má lineární odezvu v intervalu měření. Vypočítá se výsledek jako průměr ze tří měření každého proužku. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku má nejvýše 5 % bílkovin pohyblivost odlišnou od hlavního pásu. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže na elektroforeogramu porovnávacího roztoku je část bílkovin hlavního pásu uvnitř hranic uvedených na letáku přiloženém k referenčnímu přípravku.

Polymery a agregáty. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*).

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci vhodnou pro použitý chromatografický systém. Obvykle je vhodná koncentrace v rozmezí 4 g/l až 12 g/l a nastřikuje se 50 µg až 600 µg bílkoviny.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,6 m a vnitřního průměru 7,5 mm naplněné *silikagelem hydrofilním pro chromatografii R*,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min roztoku obsahujícího v litru 4,873 g *hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R*, 1,741 g *dihydrogenfosforečnanu sodného monohydrátu R*, 11,688 g *chloridu sodného R* a 50 mg *azidu sodného R*,
- detektoru, 280 nm.

Pík odpovídající polymerům a agregátům se nachází v části chromatogramu představující prázdný objem. Plocha tohoto píku dělená dvěma není větší než 5 % celkové plochy chromatogramu.

Haem. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci bílkoviny 10 g/l. Absorbance (*2.2.25*) roztoku měřená při 403 nm proti *vodě R* jako kontrolní tekutině je nejvýše 0,15.

Aktivátor prekalikreinu (*2.6.15*). Nejvýše 35 m.j. v mililitru.

Hliník. Pokud je přípravek určen k podání dialyzovaným nemocným nebo nedonošeným dětem, vyhovuje zkoušce na hliník, obsahuje-li nejvýše 200 µg Al/l; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I.*) využívající pece jako atomového generátoru.

Při přípravě roztoku se použijí nádoby z plastů. Před použitím se omyje vybavení v kyselině dusičné (200 g HNO_3/l).

Zkoušený roztok. Použije se zkoušený přípravek.
Validační roztok. Použije se *albumin lidský pro validaci hliníku BRP.*
Porovnávací roztoky. Připraví se vhodná řada porovnávacích roztoků za použití vhodného objemu základního *roztoku hliníku (10 μg Al/ml)* a známého objemu *vody R*. Je-li třeba, zředí se roztoky kyselinou dusičnou (10 g HNO_3/l) obsahující *dusičnan hořečnatý R* (1,7 g/l) a 0,05 % (*V/V*) *oktoxinolu 10 R*. Měří se absorbance při 309,3 nm. Zkoušku lze hodnotit jen v případě, že obsah hliníku stanoveného u *albuminu lidského pro validaci hliníku BRP* se neliší o více než 20 % od hodnoty uvedené v příbalovém letáku přiloženém k referenčnímu přípravku.

Draslík. Nejvýše 0,05 mmol K na gram bílkoviny, stanoví se atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22*, *Metoda I*). Intenzita emise se měří při 766 nm.

Sodík. Nejvýše 160 mmol Na v litru a nejméně 95 % a nejvýše 105 % obsahu sodíku uvedeného v označení. Stanoví se atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22, Metoda I*). Intenzita emise se měří při 589 nm.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogení látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 10 ml zkoušeného přípravku, který v litru obsahuje 35 g až 50 g bílkoviny. U přípravků obsahujících v litru 150 g až 250 g bílkoviny se na 1 kg hmotnosti králíka vstříknou 3 ml.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název přípravku,
- objem přípravku,
- obsah bílkoviny vyjádřený v gramech na litr,
- obsah sodíku vyjádřený v milimolech na litr,
- podmínky uchovávání,
- doba použitelnosti,
- že se přípravek nesmí použít, když je zakalený nebo obsahuje-li usazeninu,
- název a koncentrace všech přidaných látek (např. stabilizátor),
- zda je přípravek vhodný pro dialyzované nemocné a nedonošené děti.

Aloe extractum siccum normatum

Aloový extrakt suchý titrovaný

Synonymum. Extractum aloe siccum normatum

Připravuje se z barbadoského aloe nebo kapského aloe nebo z jejich směsi extrakcí vroucí vodou. Je-li třeba, upraví se obsah hydroxyanthracenových derivátů tak, aby činil 19,0 % až 21,0 %, počítáno jako aloin (barbaloin) ($C_{21}H_{22}O_9$; M_r 418,4), vztaženo na vysušený extrakt.

Vlastnosti

Hnědý nebo žlutohnědý prášek, mírně rozpustný ve vroucí vodě.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. K 0,25 g extraktu se přidá 20 ml *methanolu R* a zahřeje se k varu ve vodní lázni. Několik minut se protřepává a po usazení se tekutina slije. Uchovává se při teplotě asi 4 °C, použije se do 24 h.

Porovnávací roztok. 25 mg *aloinu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R* a *ethylacetatu R* (13 + 17 + 100) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a pak se postříká roztokem *hydroxidu draselného R* (100 g/l) v *methanolu R*. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je ve střední části patrna žlutě fluoreskující skvrna (aloin), která svojí polohou odpovídá hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku. V dolní části chromatogramu je světle modře fluoreskující skvrna (aloesin); mohou zde být patrné dvě žlutě fluoreskující skvrny (aloinosid A a B) (kapské aloe). Bezprostředně pod skvrnou aloinu může být skvrna fluoreskující fialově (barbadoské aloe).

B. 1 g extraktu se protřepe se 100 ml vařící *vody R*. Po ochlazení se přidá 1 g *mastku R* a zfiltruje se. K 10 ml filtrátu se přidá 0,25 g *tetraboritanu sodného R* a zahřívá se do rozpuštění. 2 ml tohoto roztoku se smíchají s 20 ml *vody R*. Roztok fluoreskuje žlutozeleně. Fluorescence je zvlášť výrazná v ultrafialovém světle při 365 nm.

Zkoušky na čistotu

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 4,0 %; provede se způsobem uvedeným v článku Extracta (Suché extrakty).

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 2,0 %.

Stanovení obsahu

Zkouška se provádí za ochrany před světlem.

0,400 g extraktu se převede do kuželové baňky na 250 ml. Navlhčí se 2 ml *methanolu R* a přidá se 5 ml *vody R* asi 60 °C teplé a důkladně se promíchá. Pak se přidá dalších 75 ml *vody R* asi 60 °C teplé a protřepává se 30 min. Po ochlazení se zfiltruje do odměrné baňky. Kuželová baňka i filtr se promyjí 20 ml *vody R*. Promývací tekutina se přidá k filtrátu v odměrné baňce a zředí se *vodou R* na 1000,0 ml. 10,0 ml tohoto roztoku se převede do baňky s kulatým dnem na 100 ml, přidá se 1 ml roztoku *chloridu železitého R* (600 g/l) a 6 ml *kyseliny chlorovodíkové R*. Směs se zahřívá 4 h ve vodní lázni pod zpětným chladičem tak, aby hladina vody ve vodní lázni přesahovala hladinu tekutiny v baňce. Po ochlazení se roztok převede do dělicí nálevky, baňka se promyje postupně 4 ml *vody R*, 4 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS* a 4 ml *vody R*. Promývací tekutiny se přidají k roztoku do dělicí nálevky. Protřepává se třikrát 20 ml *etheru R*. Spojené etherové vrstvy se protřepou dvakrát 10 ml *vody R*. Spodní vrstva se odstraní, etherová vrstva se zředí *etherem R* na 100,0 ml. 20,0 ml tohoto roztoku se opatrně odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 10,0 ml roztoku *octanu hořečnatého R* (5 g/l) v *methanolu R*.

Změří se absorbance (*2.2.25*) roztoku v maximu při 512 nm za použití *methanolu R* jako kontrolní tekutiny a vypočítá se procentuální obsah hydroxyanthracenových derivátů, počítáno jako aloin ($C_{21}H_{22}O_9$), podle vztahu:

$$\frac{A \ . \ 19{,}6}{m} \ ,$$

v němž značí:
A - absorbanci zkoušeného roztoku při 512 nm,
m - navážku extraktu v gramech.

Hodnota specifické absorbance aloinu je 255.

Uchovávání

Uchovává se způsobem uvedeným v článku Extracta (Suché extrakty).

Označování

Označuje se způsobem uvedeným v článku Extracta (Suché extrakty).

Antithrombinum III humanum densatum cryodesiccatum

Lyofilizovaný koncentrát humánního antitrombinu III

Je to přípravek tvořený glykoproteinovou frakcí získanou z lidské plazmy, který za přítomnosti přebytku heparinu inaktivuje trombin. Získává se z plazmy vyhovující požadavkům článku *Plasma humanum ad separationem*.

Po rozpuštění přípravku předepsaným způsobem v objemu rozpouštědla uvedeného v označení na obalu nebo v příbalovém letáku je účinnost antitrombinu III nejméně 25 m.j. v mililitru.

Výroba

Metoda přípravy zahrnuje postup nebo postupy, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují známá infekční agens. Jsou-li k inaktivaci virů použity v průběhu výroby nějaké látky, následující čisticí postupy se validují, aby se prokázalo, že koncentrace těchto látek je snížena na vhodnou úroveň a že jejich zbytky neohrozí bezpečnost přípravku pro nemocné.

Antitrombin III se přečistí, zkoncentruje a může se přidat vhodný stabilizátor. Specifická účinnost antitrombinu III je nejméně 3 m.j. v miligramu celkové bílkoviny bez albuminu. Koncentrát antitrombinu III se filtruje filtrem zadržujícím bakterie, asepticky se rozplní do konečných sterilních obalů a ihned se zmrazí. Pak se lyofilizuje a obaly se uzavřou ve vakuu nebo v atmosféře inertního plynu. V žádném stupni výroby se nepřidávají protimikrobní konzervační látky.

Zkouška validace

Má se prokázat, že výrobním procesem vzniká přípravek, který pravidelně vyhovuje následující zkoušce:

Frakce vázající heparin. Frakce antitrombinu III schopná vazby na heparin je nejméně 60 %. Zkouší se elektroforézou v agarosovém gelu (*2.2.31*). Připraví se roztok *agarosy pro elektroforézu R* (10 g/l) v *tlumivém roztoku barbitalovém o pH 8,4* obsahující 15 m.j. *heparinu R* v mililitru. 5 ml tohoto roztoku se naleje na čtvercovou skleněnou desku o straně 5 cm a chladí se 30 min při 4 °C. Vyříznou se dvě jamky o poloměru 2 mm, vzdálené 1 cm a 4 cm od strany desky a 1 cm od katody. Do jedné jamky se nanese 5 μl zkoušeného přípravku zředěného na roztok o účinnosti přibližně 1 m.j. antitrombinu III v mililitru. Do druhé jamky se nanese 5 μl značkovací barvy, jako např. *modři bromfenolové RS*. Nechá se působit při 4 °C elektrické pole 7 V/cm tak dlouho, až barva dosáhne anody.

V agarosovém gelu se udělá řez ve vzdálenosti 1,5 cm podél strany desky, kam byl nanesen zkoušený vzorek, a větší část gelu se odstraní. Zbývající proužek 1,5 cm široký obsahuje zkoušený materiál. Na volné místo se naleje 3,5 ml roztoku *agarosy pro elektroforézu R* (10 g/l) v *tlumivém roztoku barbitalovém o pH 8,4* obsahujícího králičí sérum proti lidskému antitrombinu III ve vhodné předem stanovené koncentraci, aby vznikl odpovídající pík o výšce nejméně 1,5 cm. Deska se umístí původním gelem směrem ke katodě, takže druhá elektroforetická migrace se děje v pravém úhlu k první. Druhá elektroforéza se nechá probíhat 16 h při konstantním elektrickém poli 2 V/cm. Desky se překryjí filtračním papírem a několika vrstvami buničiny nasáklé *roztokem chloridu sodného R* (9 g/l) a na 2 h se zatíží. Solný roztok se několikrát vymění. Desky se opláchnou *vodou R*, usuší se a obarví *modří kyselou 92 RS*.

Frakce antitrombinu III vázaného na heparin, což je pík bližší k anodě, se vypočítá z celkového množství antitrombinu III změřením ploch dvou precipitačních píků.

Vlastnosti

Bílá sypká látka nebo prášek.

Zkoušený přípravek se rozpustí předepsaným způsobem bezprostředně před provedením zkoušek totožnosti, zkoušek na čistotu (s výjimkou rozpustnosti, stanovení celkového proteinu a vody) a stanovení účinnosti.

Zkoušky totožnosti

A. Se zkoušeným přípravkem se provedou precipitační zkoušky s vhodným rozsahem druhově specifických sér. Doporučuje se provést tyto zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných v dané zemi k přípravě materiálů biologického původu. Gely se obarví *modří kyselou 92 RS*. Přípravek obsahuje bílkoviny lidského původu a dává negativní reakce se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám ostatních druhů.

B. Stanovení účinnosti antitrombinu III přispívá k důkazu přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,0 až 7,5; měří se rozpuštěný přípravek.

Rozpustnost. Rozpustí se úplně za mírného míchání do 10 min v objemu rozpouštědla uvedeného v označení na obalu nebo v příbalovém letáku; vytvoří se čirý nebo slabě zakalený bezbarvý roztok.

Osmolalita (*2.2.35*). Nejméně 240 miliosmolů na kilogram.

Celkové bílkoviny. Je-li nezbytné, zředí se přesně změřený objem zkoušeného přípravku *vodou R* na roztok obsahující přibližně 15 mg bílkoviny ve 2 ml. Ke 2,0 ml roztoku v centrifugační zkumavce se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové prosté dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se, odstřeďuje se 5 min, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Heparin (*2.7.5*). Nejvýše 0,1 m.j. účinnosti heparinu na mezinárodní jednotku účinnosti antitrombinu III. Je nutné validovat metodu stanovení heparinu pro každý specifický zkoušený přípravek vzhledem k interferenci s antitrombinem III.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %, provede se s nejméně 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje ve zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka nitrožilně vstříkne objem zkoušeného přípravku odpovídající 50 m.j. antitrombinu III, vypočítaný z účinnosti uvedené v označení.

Stanovení účinnosti

Obsah antitrombinu III ve zkoušeném přípravku se stanoví porovnáním jeho schopnosti inaktivovat za přítomnosti přebytku heparinu trombin se stejnou schopností referenčního přípravku koncentrátu antitrombinu III kalibrovaného v mezinárodních jednotkách. Proměnná množství zkoušeného přípravku se smíchají s neměnným množstvím trombinu a zbývající aktivita trombinu se stanoví za pomoci vhodného chromogenního substrátu.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu koncentrátu lidského antitrombinu III. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Postup zkoušky. Připraví se dvě nezávislé řady tří nebo čtyř ředění zkoušeného přípravku a referenčního přípravku v rozmezí 1/75 až 1/200 z 1 m.j./ml v *tlumivém roztoku trometamol-albuminovém o pH 8,4* obsahujícím 15 m.j. heparinu v mililitru.

200 μl každého ředění se 1 min až 2 min zahřívá při 37 °C. Všechna ředění se smíchají s 200 μl roztoku *trombinu hovězího R* o účinnosti 2 m.j./ml v *tlumivém roztoku trometamol-albuminovém o pH 8,4*. Míchá se a udržuje se 1 min přesně na 37 °C. Přidá se 500 μl vhodného chromogenního substrátu (např. D-fenylalanyl-L-pipekolyl-L-arginyl-4-nitroanilid rozpuštěný předepsaným způsobem ve *vodě R* na roztok o koncentraci 4 mmol/l a dále naředěný pro zkoušku *tlumivým roztokem trometamolovým s edetanem disodným o pH 8,4* na koncentraci vhodnou pro stanovení). Okamžitě se začne měřit změna absorbance při 405 nm, v měření se pokračuje nejméně 30 s. Vypočítá se rychlost změny absorbance (ΔA/min). (Zkouška může být alternativně provedena tak, že se reakce ukončí přidáním kyseliny octové a změří se absorbance při 405 nm.)

Rychlost změny absorbance (ΔA/min) je nepřímo úměrná účinnosti antitrombinu III. Úbytek absorbance nebo ΔA/min se vynese proti koncentraci na lineární stupnici a účinnost se odečte ze směrnic přímek pro referenční a zkoušený přípravek.

Ověří se validita zkoušky a účinnost zkoušeného přípravku se vypočítá obvyklými statistickými metodami pro stanovení poměru sklonů (např. *5.3* Statistické analýzy výsledků biologických zkoušek).

Stanovená účinnost je nejméně 90 % a nejvýše 110 % účinnosti uvedené v označení na obalu. Interval spolehlivosti (P = 0,95) je nejméně 90 % a nejvýše 110 % stanovené účinnosti.

Uchovávání

Uchovává se chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- obsah antitrombinu III v obalu v mezinárodních jednotkách,
- název a objem rozpouštědla, jež se použije k rozpuštění přípravku,
- je-li potřebné, množství albuminu přidaného jako stabilizátor.

† Belladonnae pulvis normatus

Práškovaný rulíkový list titrovaný

Je to práškovaný rulíkový list (180), jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo drogy s nižším obsahem alkaloidů tak, aby celkový obsah alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$; M_r 289,36), činil 0,28 % až 0,32 %, vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga má slabý pach nutkající ke zvracení.

Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

A. Prášek je tmavě zelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele listu s buňkami pokožky se stěnami zvlněnými a zvrásněnou kutikulou; anizocytické a anomocytické průduchy četnější na spodní straně listu; mnohobuněčné jednořadé krycí chlupy s hladkou kutikulou; žláznaté chlupy s jednobuněčnou hlavičkou a jednořadou mnohobuněčnou nohou nebo s mnohobuněčnou hlavičkou a jednobuněčnou nohou; okrouhlé parenchymatické buňky s mikrokrystaly šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. V práškované droze mohou být patrna: vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; téměř kulovitá pylová zrna o průměru 40 μm až 50 μm, se třemi klíčními póry, trikolpátní, s široce tečkovanou exinou; úlomky koruny s papilózní pokožkou, s četnými krycími a žláznatými chlupy výše popsaných typů; úlomky hnědožlutých semen s nepravidelně ztlustlými tečkovanými buňkami osemení.

Při hodnocení v *glycerolu 85% R* mohou být patrné krystaly laktosy.

B. 1 g se smíchá s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a 2 min se protřepává. Pak se zfiltruje, k filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Protřepává se opatrně 15 ml *etheru R* tak, aby nedošlo k tvorbě emulze. Etherová vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*, pak se zfiltruje a ether se na porcelánové misce odpaří. Ke zbytku se přidá 0,5 ml *kyseliny dusičné dýmavé R* a odpaří se do sucha na vodní lázni. Ke zbytku se přidá 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu 96% R;* vzniká tmavě fialové zbarvení.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Chromatografie, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

Zkoušený roztok. 0,6 g se smíchá s 15 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a protřepává se 15 min. Pak se zfiltruje a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do získání 20 ml filtrátu. Filtrát se smíchá s 1 ml *amoniaku 26% R* a protřepává se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R,* je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené etherové vrstvy se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, pak se zfiltrují a odpaří se do sucha na vodní lázni. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R.*

Porovnávací roztok. 50 mg *hyoscyaminiumsulfatu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R.* 15 mg *skopolaminiumbromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R.* Smíchá se 1,8 ml roztoku skopolaminiumbromidu a 8 ml roztoku hyoscyaminiumsulfatu.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl a 20 μl obou roztoků; vzdálenost mezi jednotlivými pruhy je 1 cm. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další méně výrazné skvrny; při nanášce 20 μl ve střední části chromatogramu, při nanášce 10 μl v blízkosti startu. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná. Pozoruje se po 15 min. Hnědé skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin), další skvrny již nejsou patrné.

Celkový popel *(2.4.16)*. Nejvýše 16,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové *(2.8.1)*. Nejvýše 4,0 %.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 5,0 %; 1,000 g se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

10,00 g se navlhčí směsí složenou z 5 ml *amoniaku 17,5% RS*, 10 ml *lihu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h stát. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak dlouho,

dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetrajodortuťnatanem draselným RS*. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené spodní vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a protřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Pak se chloroform slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l RS* a chloroform se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$), se vypočítá podle vztahu:

$$\frac{57{,}88\ .\ (20\ -\ n)}{(100\ -\ d)\ .\ m}\ ,$$

v němž značí:
d - ztrátu sušením v procentech,
n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
m - navážku zkoušené látky v gramech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Factor VIII coagulationis sanguinis humani cryodesiccatus

Lidský koagulační faktor VIII lyofilizovaný

Připravuje se frakcionací plazmy získané od více než deseti dárců, která odpovídá požadavkům článku *Plasma humanum ad separationem*.

Sortiment přípravků lišících se účinností a čistotou je široký. Účinnost přípravku rozpuštěného předepsaným způsobem je nejméně 3 m.j. v mililitru a nejméně 0,1 m.j. v miligramu celkových bílkovin.

Výroba

Metoda přípravy zahrnuje postup nebo postupy, u nichž bylo dokázáno, že odstraňují nebo inaktivují známé původce infekcí; jsou-li při výrobě použity látky k inaktivaci virů, je následující čisticí postup validován, aby se prokázalo, že koncentrace těchto látek byla snížena na vhodnou úroveň a že případné zbytky neovlivní bezpečnost přípravku pro nemocného.

Po přípravě se frakce obsahující faktor VIII rozpustí ve vhodném rozpouštědle a roztok se rozplní do obalů a ihned zmrazí. Poté se lyofilizuje a obaly se uzavřou ve vakuu nebo pod dusíkem tak, aby se předešlo kontaminaci. Nepřidává se žádná protimikrobní přísada, může se však přidat heparin.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý prášek nebo drobivá pevná hmota.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným souborem druhově specifických antisér se provedou precipitační zkoušky se zkoušeným přípravkem, který se bezprostředně před zkouškou rozpustí předepsaným způsobem. Doporučuje se provést zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných k přípravě látek biologického původu v příslušné zemi. Zkoušený přípravek prokazatelně obsahuje lidské bílkoviny a negativně reaguje se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných živočišných druhů.

B. Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku je zároveň zkouškou jeho totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,8 až 7,4; měří se rozpuštěný přípravek.

Rozpustnost. Do obalu se zkoušeným přípravkem se přidá předepsaný objem *vody na injekci R* teplé 20 °C až 25 °C a mírně se 30 min protřepává. Přípravek se zcela rozpustí za tvorby bezbarvého nebo slabě nažloutlého, čirého nebo lehce zakaleného roztoku. V tomto roztoku do 3 h po rozpuštění při 20 °C až 25 °C nevzniknou žádné stopy koagula.

Celkové bílkoviny. Je-li třeba, zředí se rozpuštěný přípravek roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby se získal roztok obsahující ve 2 ml asi 15 mg bílkoviny.

Ke 2,0 ml tohoto roztoku v centrifugační zkumavce s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi, která obsahuje 1 objemový díl *kyseliny sírové prosté dusíku R* a 30 objemových dílů *vody R*. Protřepe se, 5 min se odstřeďuje, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Fibrinogen. Nejvýše 80 % z celkového množství bílkovin. Rozpuštěný přípravek se zředí v poměru 1 : 10 roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l). K objemu zředěného přípravku s předpokládaným obsahem asi 15 mg fibrinogenu se přidá dostatečné množství *trombinu lidského R* k vysrážení bílkovin a nechá se 2 h stát. (Dostatečným množstvím *trombinu lidského R* se rozumí desetinásobek množství potřebného k vysrážení 1 ml roztoku lidského fibrinogenu (1 g/l) v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) během 15 s při teplotě 37 °C a pH 7,2 až 7,3.) Koagulum se oddělí a promyje roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l). Obsah dusíku se stanoví mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkoviny (fibrinogenu) se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Hemaglutininy anti-A a anti-B. Rozpuštěný přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby obsahoval 3 m.j. v mililitru. Provedou se zkoušky na hemaglutininy anti-A a anti-B nepřímou metodou (*2.6.20*). Do ředění 1 : 64 nenastane aglutinace.

Povrchový antigen hepatitidy B. Rozpuštěný přípravek se vyzkouší vhodnou citlivou metodou, jako je radioimunoanalýza. Povrchový antigen hepatitidy B se neprokáže.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 2 %; 0,500 g se 24 h suší v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 3 Pa.

Sterilita (*2.6.1*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne nitrožilně objem obsahující 10 m.j.

Neškodnost (*2.6.9*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití. Každé myši se vstříkne objem rozpuštěného přípravku obsahující 1,5 m.j. a každému morčeti se vstříkne objem obsahující 15 m.j.

Stanovení účinnosti

Provede se stanovení účinnosti lidského koagulačního faktoru VIII (*2.7.4*).

Stanovená účinnost je 80 % až 120 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti stanovení účinnosti (P = 0,95) je v rozmezí 80 % až 120 %.

Uchovávání

Uchovává se chráněn před světlem, při teplotě do 8 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet m.j. v obalu,
- obsah bílkovin v obalu,
- množství heparinu v nádobce, pokud je obsažen,
- podmínky uchovávání,
- objem *vody na injekci R*, jež se použije k rozpouštění přípravku,
- upozornění, že přípravek se musí použít ihned po rozpuštění,
- upozornění, že přípravek se nesmí použít, jestliže se vše nerozpustilo nebo vzniklo koagulum,
- upozornění, že obsah je jen na jedno použití,
- název a množství všech přidaných látek,
- že přípravek nemůže být považován za prostý viru hepatitidy,
- nejvyšší obsah fibrinogenu,
- pokud je to vhodné, že přípravek lze použít na léčbu von Willebrandovy nemoci.

Factor IX coagulationis sanguinis humani cryodesiccatus

Lidský koagulační faktor IX lyofilizovaný

Připravuje se frakcionací plazmy, která vyhovuje požadavkům článku *Plasma humanum ad separationem*.

Výroba

Metody přípravy se navrhují tak, aby se zejména předcházelo vzniků trombů a přenosu známých původců infekcí nebo aby se inaktivovaly. Přípravek, jež kromě faktoru IX může obsahovat také faktory II, X a VII, prochází filtry zadržujícími bakterie, plní se do sterilních obalů a ihned se

zmrazí. Poté se lyofilizuje a obaly se uzavřou ve vakuu nebo v atmosféře inertního plynu. Nepřidává se žádná protimikrobní konzervační látka, mohou se však přidat jiné plazmatické bílkoviny a heparin. Po rozpuštění předepsaným způsobem je účinnost nejméně 20 m.j. v mililitru a specifická účinnost nejméně 0,6 m.j. v miligramu celkových bílkovin.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě zbarvený prášek nebo pevná drobivá hmota, velmi hygroskopická. V závislosti na metodě frakcionace plazmy může být rozpuštěný přípravek zbarven např. modře, žlutě nebo zeleně.

Zkoušky totožnosti a Zkoušky na čistotu, s výjimkou zkoušek Rozpustnost a Ztráta sušením, se provedou předepsaným způsobem ihned po rozpuštění zkoušeného přípravku.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným souborem druhově specifických antisér se provedou precipitační zkoušky s rozpuštěným přípravkem. Zkoušky se provedou se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných k přípravě látek živočišného původu. Zkoušený přípravek obsahuje lidské bílkoviny a nereaguje se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných živočišných druhů.

B. Zkouška Stanovení účinnosti je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 7,5; měří se rozpuštěný přípravek.

Rozpustnost. Do 10 min se za pokojové teploty úplně rozpustí mírným třepáním v předepsaném objemu rozpouštědla.

Aktivované koagulační faktory. Jestliže zkoušený přípravek obsahuje heparin, stanoví se jeho obsah v přípravku zkouškou na heparin a heparin se zneutralizuje přidáním *protaminiumsulfatu R*. Rozpuštěný zkoušený přípravek se zředí 1 : 10 a 1 : 100 *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,5*. Do vodní lázně o teplotě 37 °C se umístí řada polystyrenových zkumavek a do každé se přidá 0,1 ml *plazmy chudé na krevní destičky R* a 0,1 ml vhodného ředění *zkoumadla cefalinového R* nebo *krevních destiček náhrady R*. Inkubuje se 60 s a poté se do zkumavek napipetuje buď 0,1 ml příslušného ředění přípravku, nebo 0,1 ml tlumivého roztoku (kontrolní roztok). Ihned nato se do každé zkumavky přidá 0,1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (3,7 g/l) předem ohřátého na 37 °C. V průběhu 30 min od výchozího ředění se měří čas, který uplyne mezi přidáním roztoku chloridu vápenatého a tvorbou koagula. Pro všechna ředění má být srážecí čas nejméně 150 s.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže srážecí čas kontrolního roztoku je alespoň 200 s.

Heparin. Nejvýše 0,5 m.j. heparinu v 1 m.j. faktoru IX. Připraví se řada roztoků obsahujících v 1 ml 0 mg až 20 mg *protaminiumsulfatu R*. Připraví se řada směsí obsahujících 0,5 ml rozpuštěného zkoušeného přípravku a 10 μl jednotlivých roztoků *protaminiumsulfatu R*.

Do vodní lázně na 37 °C se umístí řada polystyrenových zkumavek a do každé zkumavky se dá 0,1 ml *plazmy chudé na krevní destičky R* a 0,1 ml vhodného ředění *zkoumadla cefalinového R* nebo *krevních destiček náhrady R*. Inkubuje se 60 s a poté se do zkumavek napipetuje po 0,1 ml příslušné směsi rozpuštěného zkoušeného přípravku s *protaminiumsulfatem R* nebo 0,1 ml *tlumivého roztoku trometamolového o pH 7,5* (kontrolní roztok). Ihned nato se do každé zkumavky přidá 0,1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (3,7 g/l) předem ohřátého na 37 °C a měří se čas, který

uplyne mezi přidáním roztoku chloridu vápenatého a tvorbou koagula. Množství protaminiumsulfatu potřebného k neutralizaci heparinu v 0,5 ml zkoušeného přípravku odpovídá množství, které je obsaženo ve směsi s nejkratším zaznamenaným srážecím časem. Obsah heparinu se vypočte z předpokladu, že 10 μg protaminiumsulfatu neutralizuje 1 m.j. heparinu. Zkoušku lze hodnotit, jestliže srážecí čas v kontrolním roztoku je nejméně 200 s.

Povrchový antigen hepatitidy B. Rozpuštěný přípravek se zkouší vhodnou citlivou metodou jako je radioimunoanalýza. Povrchový antigen hepatitidy B se neprokáže.

Trombin. Jestliže zkoušený přípravek obsahuje heparin, stanoví se jeho množství, jak je uvedeno ve zkoušce Heparin, a heparin se neutralizuje přídavkem *protaminiumsulfatu R.* Ve dvou zkumavkách se smíchají stejné objemy rozpuštěného přípravku a roztoku *fibrinogenu R* (3 g/l). Jedna zkumavka se uchovává 6 h při 37 °C, druhá 24 h při pokojové teplotě. Ve třetí zkumavce se smíchají stejné objemy roztoku fibrinogenu a roztoku *trombinu R* (1 m.j./ml) a zkumavka se zahřívá ve vodní lázni při 37 °C. Ve zkumavkách obsahujících zkoušený přípravek nedojde ke srážení, ve zkumavce s trombinem se koagulum vytvoří do 30 s.

Celkové bílkoviny. Je-li to třeba, zředí se přesně odměřený objem rozpuštěného přípravku *vodou R* tak, aby se získal roztok obsahující ve 2 ml asi 15 mg bílkoviny. Ke 2 ml tohoto roztoku v centrifugační zkumavce s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi objemových dílů *kyseliny sírové prosté dusíku R* a *vody R* (1 + 30). Protřepe se, 5 min se odstřeďuje, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkovin se vypočítá násobením výsledku faktorem 6,25.

Ztráta sušením *(2.2.32)*. Nejvýše 2,0 %; 0,200 g se 24 h suší v exsikátoru nad *oxidem fosforečným R* při tlaku nepřevyšujícím 3 Pa.

Sterilita (*2.6.1*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne nitrožilně objem rozpuštěného přípravku odpovídající 30 m.j., počítáno podle účinnosti uvedené v označení na obalu.

Neškodnost (*2.6.9*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití. Každé myši se vstříkne objem rozpuštěného přípravku odpovídající 2 m.j. a každému morčeti se vstříkne objem rozpuštěného přípravku odpovídající 15 m.j., počítáno podle účinnosti uvedené v označení na obalu.

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním množství potřebného ke snížení srážecího času směsi obsahující látky jiné než faktor IX, jež se podílejí na srážení krve, s množstvím porovnávacího přípravku, kterého je zapotřebí k vyvolání stejného účinku. K tomu je nutné, aby porovnávací přípravek byl kalibrován v mezinárodních jednotkách. Mezinárodní jednotkou je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, kterým je lyofilizovaný koncentrát lidského koagulačního faktoru IX. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Stanovená účinnost je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti stanovené účinnosti (P = 0,95) je v rozmezí 64 % až 156 % deklarované účinnosti.

Zkoušený přípravek a porovnávací přípravek se samostatně rozpustí podle návodu uvedeného v označení na obalu a ihned se zkouší. Jestliže zkoušený přípravek obsahuje heparin, stanoví se jeho množství, jak je uvedeno ve zkoušce Heparin, viz Zkoušky na čistotu, a heparin se neutralizuje

přídavkem *protaminiumsulfatu R*. Zkoušený přípravek a porovnávací přípravek se zředí dostatečným množstvím *tlumivého roztoku imidazolového o pH 7,3* tak, aby se získaly roztoky obsahující 0,5 m.j. až 2,0 m.j. v mililitru. Za použití směsi objemových dílů roztoku *citronanu sodného R* (38 g/l) a *tlumivého roztoku imidazolového o pH 7,3* (1 + 5) se připraví řada dvojnásobných ředění v rozmezí 1 : 10 až 1 : 80. Tato ředění je třeba připravit přesně a ihned je použít. Inkubační zkumavky se vloží do vodní lázně zahřáté na 37 C. Do každé z nich se dá 0,1 ml *plazmy substrátu R2* a 0,1 ml příslušného ředění zkoušeného nebo porovnávacího přípravku. Do každé zkumavky se přidá 0,1 ml vhodného ředění *zkoumadla cefalinového R* nebo *krevních destiček náhrady R* a 0,1 ml suspenze *kaolinu lehkého R* 0,5 g ve 100 ml v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a zkumavky se 10 min pravidelně jemně protřepávají. Do každé zkumavky se pak přidá 0,1 ml roztoku *chloridu vápenatého R* (7,4 g/l). Na stopkách se změří srážecí čas, což je interval mezi přidáním chloridu vápenatého a prvními příznaky tvorby fibrinu, který je možno určit vizuálně nebo vhodným přístrojem.

Aby se zajistilo, že plazma substrát neobsahuje zjistitelnou kontaminaci faktorem IX, provede se slepá zkouška, v níž se místo zkoušeného přípravku použije odpovídající množství směsi objemových dílů roztoku *citronanu sodného R* (38 g/l) a *tlumivého roztoku imidazolového o pH 7,3* (1 + 5). Zkoušku lze hodnotit, jestliže srážecí čas slepé zkoušky je v rozmezí 100 s až 200 s.

Uchovávání

Při teplotě pod 8 C, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet m.j. v obalu,
- množství heparinu v obalu, pokud je obsažen,
- název a množství tekutiny, která se použije k rozpuštění,
- upozornění, že přípravek se musí použít ihned po rozpuštění, a to pouze jednou,
- upozornění, že přípravek se nesmí použít, jestliže je roztok zakalený nebo se vše nerozpustilo,
- podmínky uchovávání,
- název a množství všech přidaných látek,
- množství bílkovin v obalu,
- upozornění, že přípravek nemůže být považován za prostý přenosných původců infekčních onemocnění.

Fibrinogenum humanum cryodessicatum

Lyofilizovaný lidský fibrinogen

Je to rozpustná složka lidské plazmy, která se přemění na fibrin přídavkem trombinu. Získává se z plazmy, která vyhovuje článku *Plasma humanum ad separationem.*

Přípravek může obsahovat pomocné látky, jako jsou soli, tlumivé přísady a stabilizátory. Když se rozpustí v objemu rozpouštědla uvedeného v označení,roztok obsahuje nejméně 10g/l fibrinogenu.

Výroba

Výrobní metody zahrnují krok nebo kroky, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují známá infekční agens. Pokud se při výrobě používají látky k inaktivaci virů, následující purifikační postupy se validují tak, aby se dokázalo, že koncentrace těchto látek je snížena na vhodnou úroveň a žádný ze zbytků nemůže ohrozit bezpečnost přípravku pro nemocného.

K použité plazmě se nepřidávají žádná antibiotika a přípravek neobsahuje žádnou protimikrobní konzervační látku.

Použité metody výroby jsou takové, aby se získal fibrinogen se specifickou účinností (obsah fibrinogenu vzhledem k celkovému obsahu bílkovin) nejméně 80 %. Obsah fibrinogenu se stanoví vhodnou metodou, jakou je metoda popsaná v odstavci Stanovení obsahu, a celkový obsah bílkovin se stanoví vhodnou metodou popsanou v článku *Albumini humani solutio*. Pokud se přidává bílkovinný stabilizátor (například lidský albumin), požadavek na specifickou účinnost platí pro fibrinogen před přidáním stabilizátoru. Albumin se může též získat spolu s fibrinogenem při frakcionaci a specifické stanovení albuminu se potom provádí vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*) a pro výpočet specifické účinnosti se zjištěné množství albuminu odečte od celkového obsahu bílkovin.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý prášek nebo drobivá pevná látka.

Zkoušky totožnosti

A. Za použití vhodných druhově specifických antisér se provedou se zkoušeným přípravkem precipitační zkoušky. Přípravek se rozpustí podle údajů v označení bezprostředně před použitím. Doporučuje se použití specifických antisér proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných k přípravě látek biologického původu. Přípravek prokazatelně obsahuje lidské bílkoviny a dává negativní výsledek se specifickými antiséry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

B. Stanovení obsahu je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 7,5; měří se rozpuštěný vzorek.

Osmolalita (*2.2.35*). Osmolalita rozpuštěného vzorku je nejméně 240 mosm/kg.

Rozpustnost. K obsahu nádoby se přidá objem rozpouštědla uvedený v označení. Přípravek se rozpustí do 30 min při 20 °C až 25 °C a tvoří se téměř bezbarvý lehce opalescentní roztok.

Stabilita roztoku. Vzniklý roztok se nechá stát při 20 °C až 25 °C. Do 60 min se netvoří gel.

Povrchový antigen hepatitidy B. Rozpuštěný přípravek se zkouší imunochemickou metodou (*2.7.1*) vhodné citlivosti takové, jakou má radioimunoanalýza. Povrchový antigen hepatitidy B není zjištěn.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Sterilita (*2.6.1*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne nitrožilně objem rozpuštěného vzorku odpovídající nejméně 30 mg fibrinogenu, vypočítáno z množství uvedeného v označení.

Stanovení obsahu

0,2 ml rozpuštěného přípravku se smíchá s 2 ml vhodného tlumivého roztoku (pH 6,6 až 6,8) obsahujícího dostatečné množství thrombinu (přibližně 3 m.j./ml) a vápníku (0,05 mol/l). Udržuje se 20 min při 37 °C, precipitát se oddělí odstřeďováním (5000 g_n, 20 min), důkladně se promyje roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l). Obsah dusíku se stanoví po mineralizaci kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah fibrinogenu (srazitelné bílkoviny) se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,0. Obsah je 70 % až 130 % množství fibrinogenu uvedeného v označení.

Uchovávání

Chráněn před světlem.

Označování

V označení se uvede:
- množství fibrinogenu v obalu,
- název a objem rozpouštědla, které se má použít k rozpuštění přípravku,
- kde je to vhodné, název a množství bílkovinného stabilizátoru v přípravku.

† Hyoscyami pulvis normatus

Práškovaný blínový list titrovaný

Je to práškovaný (180) list blínu, jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo drogy s nižším obsahem alkaloidů tak, aby celkový obsah alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$; M_r 289,4), činil 0,05 % až 0,07 %, vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga má nepříjemný pach nutkající ke zvracení.
Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

A. Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky čepele s buňkami pokožky se zvlněnými stěnami a hladkou kutikulou, anizocytické a anomocytické průduchy (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu; mnohobuněčné, jednořadé krycí chlupy a žláznaté chlupy s tenkými hladkými stěnami; žláznaté chlupy mají dlouhé mnohobuněčné nohy nebo krátké jednobuněčné nohy a dvoubuněčné nebo mnohobuněčné kyjovité hlavičky. Dorziventrální mezofyl s jednořadým parenchymem a houbovým parenchymem obsahujícím jednoduché nebo zdvojené krystaly šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. Vlákna a šroubovitě ztlustlé cévy stonku; kulovitá pylová zrna o průměru až 60 μm, se třemi klíčními póry, s téměř hladkou exinou. Úlomky koruny s papilózní pokožkou; úlomky semen obsahující žlutohnědé, zprohýbané, ztlustlé sklereidy osemení; občas drúzy nebo písek šťavelanu vápenatého.

Při hodnocení v *glycerolu 85% R* mohou být patrné krystaly laktosy.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografie, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením i velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů.

C. 1 g se protřepává 2 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*. Zfiltruje se, k filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Protřepává se opatrně s 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R* tak, aby se netvořila emulze. Etherová vrstva se vysuší *síranem sodným bezvodým R* a pak se zfiltruje. Ether se odpaří na porcelánové misce, přidá se 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného R* (30 g/l) v *lihu 96 % R;* vznikne tmavě fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 2,0 g se protřepávají 15 min s 20 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a pak se zfiltruje. Filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do konečného objemu 25 ml filtrátu. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a protřepe se dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*. Je-li třeba, oddělí se vrstvy odstředěním. Spojené etherové výtřepky se vysuší *síranem sodným bezvodým R*, zfiltrují se a odpaří se na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

Porovnávací roztok. 50 mg *hyoscyaminiumsulfatu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolaminiumbromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. 3,8 ml roztoku hyoscyaminiumsulfatu a 4,2 ml skopolaminiumbromidu se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese se odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl a 20 μl obou roztoků; vzdálenost mezi jednotlivými pruhy je 1 cm. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká *jodobismutitanem draselným RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrny i další skvrny; při nanášce 20 μl ve střední části chromatogramu, při nanášce 10 μl v blízkosti startu. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná. Pozoruje se 15 min. Skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, nejsou však šedomodré (atropin); další skvrny již nejsou patrné.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 30,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 12,0 %.

Ztráta sušením (*2.3.32*). Nejvýše 5,0 %. 1,000 g drogy se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

40,0 g se povlhčí směsí složenou z 8 ml *amoniaku 26% R*, 10 ml *lihu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R* a důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h stát. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do

sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a přítomnost alkaloidů se ověří *tetrajodortuťnatanem draselným RS*. Perkolát se zahustí na vodní lázni na asi 50 ml a pomocí *etheru prostého peroxidických látek R* se převede do dělicí nálevky. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepává se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené spodní vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17,5% RS* a protřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R*, nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Chloroform se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha a odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliy sírové 0,01 mol/l VS;* chloroform se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor R* a nadbytek kyseliny se titruje *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$), se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{57{,}88 \,.\, (20 - n)}{(100 - d) \,.\, m},$$

v němž značí:
d - ztrátu sušením v procentech,
n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Immunoglobulinum humanum anti-D

Lidský imunoglobulin anti-D

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Přípravek je určen k nitrosvalovému podání. Získává se z plazmy D-negativních dárců krve, kteří byli imunizováni proti antigenu D. Obsahuje specifické protilátky proti antigenu D červených krvinek a může též obsahovat malá množství protilátek proti jiným krevním skupinám, např. anti-C, anti-E, anti-A nebo anti-B. Může se přidat normální lidský imunoglobulin. Je rozplňován do obalů obsahujících nejméně 1 ml, což se vztahuje i na lyofilizovaný přípravek po rozpuštění.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

U tekutého přípravku se provádí zrychlená stabilitní zkouška zahříváním hotového výrobku po čtyři týdny při 37 °C; ztráta anti-D účinnosti po zahřívání nepřekročí 20 % výchozí hodnoty.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním množství, které je zapotřebí k aglutinaci D-pozitivních červených krvinek, s množstvím referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, které je zapotřebí k dosažení stejného účinku.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Použijí se smíšené D-pozitivní červené krvinky, ne starší než 7 dní, vhodně uchovávané a získané od nejméně čtyř dárců R_1R_1. Ke vhodnému objemu krvinek třikrát propraných roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) se přidá stejný objem *bromelinu RS*, nechá se 10 min stát při 37 °C, odstředí se, supernatantní tekutina se odstraní a krvinky se třikrát promyjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l). 20 objemových dílů červených krvinek se suspenduje ve směsi 15 objemových dílů séra inertní skupiny AB, 20 objemových dílů *roztoku hovězího albuminu R* (300 g/l) a 45 objemových dílů roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Tato suspenze se umístí do vody s ledem a stále se promíchává.

Použitím kalibrovaného automatického dilutoru se připraví vhodná ředění zkoušeného a referenčního přípravku. K ředění se použije roztok *albuminu hovězího R* (5 g/l) v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l).

Použije se vhodný přístroj pro automatickou kontinuální analýzu. Teplota potrubí, kromě inkubačních zavitů, se udržuje na 15 °C. Do potrubí přístroje se napumpuje suspenze červených krvinek rychlostí 0,1 ml/min a roztok *methylcelulosy 450 R* (3 g/l) rychlostí 0,05 ml/min. Ředění zkoušeného a referenčního přípravku se provádějí rychlostí 0,1 ml/min po dobu 2 min a po každém z nich se provede opláchnutí ředicím roztokem rychlostí 0,1 ml/min po dobu 4 min před zavedením dalšího ředění.

Vzduch se přivádí rychlostí 0,6 ml/min. Inkubuje se 18 min při 37 °C a pak se shluk rozptýlí přivedením roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího vhodné smáčedlo (např. *polysorbát 20* v konečné koncentraci 0,02 % (*V/V*)) rychlostí 1,6 ml/min, aby se zabránilo roztržení bublinové struktury. Aglutináty se nechají usadit a dvakrát se promyjí, nejprve při 0,4 ml/min a poté 0,6 ml/min. Neaglutinované červené krvinky se lyzují roztokem, který obsahuje *oktoxinol 10 R* (5 ml/l), *ferrikyanid draselný R* (0,2 g/l), *hydrogenuhličitan sodný R* (1 g/l) a *kyanid draselný R* (0,05 g/l) přiváděným rychlostí 2,5 ml/min. Desetiminutová prodlévací spirála je zavedena ke konverzi hemoglobinu. Průběžně se zaznamenává absorbance (*2.2.25*) hemolyzátu při vlnové délce mezi 540 nm až 550 nm. Stanoví se rozmezí koncentrace protilátek, při němž je mezi koncentrací a výslednou změnou absorbance (ΔA) lineární závislost. Z výsledků se sestrojí standardní křivka a její lineární část se použije ke stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.

Účinnost zkoušeného přípravku se v mezinárodních jednotkách na mililitr vypočítá ze vzorce:

$$\frac{a \,.\, d}{D},$$

v němž značí:

d - faktor ředění zkoušeného přípravku, u kterého se zjistila daná hodnota ΔA,

D - faktor ředění referenčního přípravku, u něhož se zjistila stejná hodnota ΔA,

a - účinnost ředění D referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách na mililitr.

Pro lyofilizovaný přípravek je zjištěná účinnost v mezinárodních jednotkách v obalu nejméně 90 % a nejvíce 111 % deklarované účinnosti a interval spolehlivosti (P = 0,95) zjištěné účinnosti je nejméně 80 % a nejvíce 125 % deklarované účinnosti.

Pro tekutý přípravek je zjištěná účinnost v mezinárodních jednotkách na nádobku nejméně 90 % a nejvíce 133 % deklarované účinnosti a interval spolehlivosti (P = 0,95) zjištěné účinnosti je nejméně 80 % a nejvíce 148 % zjištěné účinnosti.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.
V označení na obalu se uvede počet mezinárodních jednotek v obalu.

Immunoglobulinum humanum hepatitidis A

Lidský imunoglobulin proti hepatitidě A

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Přípravek je určen k nitrosvalovému podání. Získává se z plazmy nebo séra vybraných dárců, kteří mají protilátky proti viru hepatitidy A. Může se přidat normální lidský imunoglobulin.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním titru protilátek zkoušeného přípravku s titrem referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách za použití imunoanalýzy vhodné citlivosti a specifity (*2.7.1* Imunochemické metody).

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku immunoglobulinu proti hepatitidě A. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Deklarovaná účinnost je nejméně 600 I.U. v mililitru. Stanovená účinnost není menší než účinnost deklarovaná. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvýše 125 %.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

Označování

V označení na obalu se uvede počet mezinárodních jednotek v obalu.

Immunoglobulinum humanum hepatitidis B

Lidský imunoglobulin proti hepatitidě B

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Přípravek je určen k nitrosvalovému podání. Získává se z plazmy vybraných nebo imunizovaných dárců krve, která obsahuje protilátky proti povrchovému antigenu hepatitidy B. Může se přidat normální lidský imunoglobulin.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

Stanovení účinnosti

Učinnost se stanoví porovnáním titru protilátek zkoušeného přípravku s titrem referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách za použití imunoanalýzy vhodné citlivosti a specifity (*2.7.1.* Imunochemické metody).

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v určitém množství mezinárodního referenčního přípravku imunoglobulinu proti hepatitidě B. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Deklarovaná účinnost je nejméně 100 m.j. v mililitru. Stanovená účinnost není menší než účinnost deklarovaná. Interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvíce 125 %.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale.*

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale.*

V označení na obalu se uvede počet mezinárodních jednotek v obalu.

Immunoglobulinum humanum hepatitidis B ad usum intravenosum

Lidský imunoglobulin proti hepatitidě B pro intravenózní použití

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Získává se z plazmy vybraných nebo též imunizovaných dárců krve, jejichž plazma obsahuje protilátky proti povrchovému antigenu hepatitidy B. Může se přidat normální lidský imunoglobulin pro intravenózní použití.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním titru protilátek zkoušeného přípravku s titrem referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách za použití imunoanalýzy vhodné citlivosti a specifity (*2.7.1* Imunochemické metody).

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku imunoglobulinu proti hepatitidě B. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Deklarovaná účinnost je nejméně 50 m.j. v mililitru. Stanovená účinnost není menší než účinnost deklarovaná. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvíce 125 %.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum*.

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum*.

V označení na obalu se uvede minimální počet mezinárodních jednotek v obalu.

Immunoglobulinum humanum morbillicum

Lidský imunoglobulin proti spalničkám

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, převážně imunoglobulin G. Je určen k nitrosvalovému podání. Získává se z plazmy obsahující specifické protilátky proti viru spalniček. Může se přidat normální lidský imunoglobulin.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou nejmenšího počtu dárců a nejnižšího obsahu celkových bílkovin.

Stanovení účinnosti

Účinnost tekutého přípravku a lyofilizovaného po rekonstituci podle označení je nejméně 50 m.j. neutralizačních protilátek proti spalničkovému viru v mililitru.

Účinnost se stanoví porovnáním titru protilátek zkoušeného imunoglobulinu a referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách za použití čelenžní dávky spalničkového viru ve vhodném systému buněčné kultury. Může se použít oprávněnou autoritou schválená, stejně citlivá a přesná metoda, která odpovídá neutralizační účinnosti proti viru spalniček v porovnání s referenčním přípravkem.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti spalničkovému viru obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku lidského séra proti spalničkám. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Připraví se řada dvojnásobných ředění zkoušeného přípravku a refenčního přípravku. Každé ředění se smíchá se stejným objemem suspenze spalničkového viru obsahující asi 100 $CCID_{50}$ v 0,1 ml a inkubuje se 2 h při 37 °C chráněno před světlem. Pro každou směs se použije nejméně

šest buněčných kultur, na každou z nich se inokuluje 0,2 ml připravené směsi a inkubuje se nejméně 10 dní. Kultury se vyšetří na účinnost viru a porovnává se ředění obsahující nejnižší množství imunoglobulinu, které je schopno neutralizovat virus, s odpovídajícím ředěním referenčního přípravku.

Vypočítá se účinnost zkoušeného imunoglobulinu v mezinárodních jednotkách vyjadřujících množství neutralizačních protilátek proti viru spalniček v jednom mililitru přípravku.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

V označení na obalu se uvede množství mezinárodních jednotek v obalu.

Immunoglobulinum humanum normale

Normální lidský imunoglobulin

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G (IgG). Přítomny mohou být i jiné bílkoviny. Normální lidský imunoglobulin obsahuje IgG-protilátky normálních dárců krve a je určen k nitrosvalovému podání.

Získává se z plazmy, která vyhovuje požadavkům článku *Plasma humanum ad separationem*. K použité plazmě se nepřidávají žádná antibiotika.

Výroba

Výrobní postup zahrnuje stupeň nebo stupně, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují známá infekční agens; jsou-li k inaktivaci virů použity nějaké látky, ověří se, že jejich rezidua přítomná v konečném výrobku nemají žádné nežádoucí účinky na nemocné léčené imunoglobulinem.

U přípravku se prokáže vhodnými zkouškami na zvířatech a klinicky se ověří, že přípravek je dobře snášen po intramuskulárním podání.

Připravuje se ze směsi od nejméně 1000 dárců metodou, u které je prokázáno, že vede k výrobě přípravku, který:

- nepřenáší infekci,
- při koncentraci bílkoviny 160 g/l obsahuje protilátky, z nichž alespoň pro dvě (jednu virovou a jednu bakteriální) je dosažitelný mezinárodní standard nebo referenční přípravek, a koncentrace těchto protilátek je alespoň 10x vyšší oproti výchozímu směsnému materiálu.

Normální lidský imunoglobulin se připravuje jako stabilizovaný roztok např. v roztoku chloridu sodného (9 g/l), v roztoku glycinu (22,5 g/l), nebo jedná-li se o přípravek k lyofilizaci, v roztoku glycinu (60 g/l). Vícedávkové přípravky obsahují protimikrobní konzervační látky, jednodávkové přípravky je neobsahují. Jak u protimikrobních látek, tak stabilizátorů se prokáže, že v množství, ve kterém jsou přítomny, nemají škodlivý vliv na hotový přípravek. Roztok se filtruje přes bakteriální filtry.

Stabilita přípravku se dokládá vhodnými zkouškami prováděnými během vývojové studie.

Vlastnosti

Tekutý přípravek je čirý, světle žlutý nebo světle hnědý, při uchovávání se může vytvořit slabý zákal nebo malé množství jemných částic. Lyofilizovaný přípravek je bílý nebo světle žlutý prášek nebo tuhá drobivá hmota.

Lyofilizovaný přípravek se rozpouští podle návodu uvedeného v označení bezprostředně před provedením zkoušek totožnosti a zkoušek na čistotu, kromě zkoušky Rozpustnost a Voda, semimikrostanovení.

Zkoušky totožnosti

A. U zkoušeného přípravku se provedou precipitační zkoušky s druhově specifickými antiséry. Doporučuje se provést zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat v příslušné zemi obvykle používaných k přípravě látek biologického původu. Přípravek obsahuje lidské bílkoviny a dává negativní reakci se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

B. Provádí se vhodnou elektroforetickou technikou. Použije se sérum proti normálnímu lidskému séru a porovná se normální lidské sérum a zkoušený přípravek, obojí zředěno tak, aby 1 l obsahoval 10 g bílkovin. Hlavní složka zkoušeného přípravku odpovídá IgG složce normálního lidského séra. Roztok může vykazovat malá množství jiných plazmatických bílkovin.

Zkoušky na čistotu

Rozpustnost. Lyofilizovaný přípravek se rozpustí předepsaným způsobem. Přípavek se do 20 min při teplotě 20 °C až 25 °C úplně rozpustí.

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,4 až 7,2; zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na roztok obsahující v litru 10 g bílkovin.

Celkové bílkoviny. Přípravek obsahuje 100 g až 180 g bílkovin v litru a 90 % až 110 % deklarovaného množství bílkovin. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby se získal roztok obsahující ve 2 ml asi 15 mg bílkovin. Ke 2,0 ml tohoto roztoku v centrifugační zkumavce s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi, která obsahuje 1 objemový díl *kyseliny sírové bez dusíku R* a 30 objemových dílů *vody R*. Protřepe se, 5 min se odstřeďuje, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Složení bílkovin. Stanoví se zónovou elektroforézou (*2.2.31*) za použití proužků vhodného celulosoacetatového gelu jako nosiče a *tlumivého roztoku barbitalového o pH 8,6 (1)* jako elektrolytu.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby koncentrace bílkovin byla 50 g/l.
Porovnávací roztok. Lidský imunoglobulin pro elektroforézu BRP se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby koncentrace bílkovin byla 50 g/l.

Na proužek se nanese 2,5 μl zkoušeného roztoku jako pruh 10 mm nebo se nanese 0,25 μl na milimetr, jsou-li použity užší proužky. Stejným způsobem se na jiný proužek nanese porovnávací roztok. Nechá se působit takové elektrické pole, aby se pruh albuminu normálního lidského séra, nanesený na kontrolní proužek, posunul alespoň o 30 mm. Proužek se 5 min barví *černí amido 10B RS*. Odbarvení se provede směsí 10 objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a 90 objemových

dílů *methanolu R* tak, aby došlo k odbarvení pozadí. Transparence pruhů se vyvolá směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *methanolu R* (19 + 81). Změří se absorbance pruhů při 600 nm na přístroji, který dává lineární odpověď v rozsahu celého měření. Stanoví se výsledek jako průměr ze tří měření z každého proužku. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku má nejvýše 10 % bílkovin mobilitu odlišnou od hlavního pásu. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže na elektroforeogramu porovnávacího roztoku je podíl bílkovin hlavního pásu v mezích uvedených v příbalovém letáku referenčního přípravku.

Rozdělení podle molekulární velikosti. Stanoví se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*)

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci vhodnou pro použitý chromatografický systém. Zpravidla je tato koncentrace v rozmezí 4 g/l až 12 g/l a vstřikuje se 50 μg až 600 μg bílkovin.
Porovnávací roztok. Lidský imunoglobulin BRP se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na stejnou koncentraci bílkovin jako u zkoušeného roztoku.

Chromatografický postup se obvykle provede za použití:
- kolony délky 0,6 m a vnitřního průměru 7,5 mm naplněné *silikagelem hydrofilním pro chromatografii R*,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min, kterou je roztok obsahující v litru: 4,873 g *hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R*, 1,741 g *dihydrogenfosforečnanu sodného monohydrátu R*, 11,688 g *chloridu sodného R* a 50 mg *azidu sodného R*,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Na chromatogramu porovnávacího roztoku odpovídá hlavní pík monomeru IgG a pík odpovídající dimeru má relativní retenční čas asi 0,85, vztaženo k monomeru. Píky na chromatogramu zkoušeného roztoku se porovnají s chromatogramem porovnávacího roztoku. Každý pík s retenčním časem kratším, než je retenční čas dimeru, odpovídá polymerům a agregátům.

Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže relativní retenční čas píků monomeru a dimeru se shoduje s odpovídajícími píky na chromatogramu porovnávacího roztoku a je 1 ± 0,02; součet ploch píků odpovídajících monomeru a dimeru je nejméně 85 % celkové plochy píků a plocha píků odpovídajících polymerům a agregátům je nejvýše 10 % celkové plochy píků.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; zkouší se u lyofilizovaných přípravků s 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 1 ml zkoušeného přípravku.

Protilátky proti povrchovému antigenu hepatitidy B. Nejméně 0,5 m.j. na gram imunoglobulinu, stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Normální lidský imunoglobulin určený k profylaxi hepatitidy A vyhovuje následující doplňující zkoušce:

Protilátky proti viru hepatitidy A. Stanoví se srovnáním s porovnávacím přípravkem kalibrovaným v mezinárodních jednotkách za použití imunoanalýzy vhodné citlivosti a specifity (*2.7.1*).

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku imunoglobulinu proti hepatitidě A. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Deklarovaná účinnost je nejméně 100 m.j. v mililitru. Stanovená účinnost není nižší než deklarovaná účinnost. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvýše 125 %.

Uchovávání

Tekutý přípravek se uchovává v bezbarvých skleněných obalech chráněn před světlem. Lyofilizovaný přípravek se uchovává v bezbarvých skleněných obalech ve vakuu nebo v atmosféře inertního plynu, chráněn před světlem.

Označování

V označení obalu se uvede:
- u tekutého přípravku jeho objem v obalu a obsah bílkovin vyjádřený v gramech na litr,
- u lyofilizovaného přípravku množství bílkovin v obalu,
- způsob podání,
- podmínky uchovávání,
- doba použitelnosti,
- u lyofilizovaného přípravku název nebo složení a objem tekutiny k rekonstituci, jež se má přidat,
- kde je to vhodné, že přípravek je vhodný k profylaxi infekce hepatitidy A,
- kde je to vhodné, účinnost proti hepatitidě A v mezinárodních jednotkách v mililitru,
- kde je to vhodné, název a množství protimikrobní konzervační látky v přípravku.

Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum

Normální lidský imunoglobulin pro nitrožilní podání

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G (IgG). Přítomny mohou být i jiné bílkoviny. Obsahuje IgG-protilátky normálních dárců krve. Tento článek se nevztahuje na záměrně připravené přípravky obsahující fragmenty nebo chemicky pozměněný IgG.

Získává se z plazmy, která vyhovuje požadavkům článku *Plasma humanum ad separationem*. K použité plazmě se nepřidávají žádná antibiotika.

Výroba

Výrobní postup zahrnuje stupeň nebo stupně, které prokazatelně odstraňují nebo inaktivují známá infekční agens; jsou-li k inaktivaci virů použity nějaké látky, musí být ověřeno, že jejich rezidua přítomná v konečném výrobku nemají žádný nežádoucí účinek na nemocné léčené imunoglobulinem.

U přípravku se prokáže vhodnými zkouškami na zvířatech a klinicky ověří, že přípravek je dobře snášen po nitrožilním podání.

Připravuje se ze směsi od nejméně 1000 dárců metodou, u které je prokázáno, že vede k výrobě přípravku, který:
- nepřenáší infekci,
- při koncentraci imunoglobulinu 50 g/l obsahuje protilátky, z nichž na nejméně dvě (jednu virovou a jednu bakteriální) jsou dosažitelné mezinárodní standardy nebo referenční přípravky; koncentrace těchto protilátek je ve srovnání s výchozí směsnou surovinou nejméně trojnásobná,
- má definované rozdělení podtříd imunoglobulinu G,
- vyhovuje zkoušce na Fc funkci imunoglobulinu (*2.7.9*).

Normální lidský imunoglobulin pro nitrožilní podání se připravuje jako stabilizovaný roztok nebo jako lyofilizovaný přípravek. Může se přidat stabilizátor. V obou případech se přípravek filtruje filtrem zadržujícím bakterie. Nepřidává se žádná protimikrobní konzervační látka ani při frakcionaci, ani k hotovému nerozplněnému roztoku.

Stabilita přípravku se doloží vhodnými zkouškami prováděnými během vývojové studie.

Vlastnosti

Tekutý přípravek je čirý nebo slabě opalizující, bezbarvý nebo slabě žlutý. Lyofilizovaný přípravek je bílý nebo světle žlutý prášek nebo tuhá drobivá hmota.

Lyofilizovaný přípravek se rozpouští podle návodu uvedeného na štítku bezprostředně před provedením zkoušek totožnosti a zkoušek na čistotu, kromě zkoušky Rozpustnost a Voda, semimikrostanovení.

Zkoušky totožnosti

A. U zkoušeného přípravku se provede precipitační zkouška s druhově specifickými antiséry. Doporučuje se provést zkoušky se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat v příslušné zemi obvykle používaných k přípravě látek biologického původu. Přípravek obsahuje lidské bílkoviny a dává negativní reakci se specifickými séry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

B. Provádí se vhodnou elektroforetickou technikou. Použije se sérum proti normálnímu lidskému séru a porovná se normální lidské sérum a zkoušený přípravek, obojí zředěno tak, aby 1 l obsahoval 10 g bílkovin. Hlavní složka zkoušeného přípravku odpovídá IgG složkám normálního lidského séra. Roztok může vykazovat malá množství jiných plazmatických bílkovin; je-li jako stabilizátor přidán lidský albumin, může být považován za hlavní složku.

Zkoušky na čistotu

Rozpustnost. Lyofilizovaný přípravek se rozpustí předepsaným způsobem. Přípravek se do 30 min při teplotě 20 °C až 25 °C úplně rozpustí.

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,0 až 7,4; zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na roztok obsahující 10 g bílkovin v litru.

Osmolalita (*2.2.35*). Nejméně 240 mosmol/kg.

Celkové bílkoviny. Přípravek obsahuje nejméně 30 g/l a 90 % až 110 % deklarovaného množství bílkovin. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby se získal roztok obsahující ve 2 ml asi 15 mg bílkovin. Ke 2,0 ml tohoto roztoku v centrifugační zkumavce s kulatým dnem se přidají 2 ml roztoku *molybdenanu sodného R* (75 g/l) a 2 ml směsi, která obsahuje 1 objemový díl *kyseliny sírové bez dusíku R* a 30 objemových dílů *vody R*. Protřepe se, 5 min se odstřeďuje, supernatantní tekutina se sleje a převrácená zkumavka se nechá odkapat na filtrační papír. Ve zbytku se stanoví dusík mineralizací s kyselinou sírovou (*2.5.9*) a obsah bílkovin se vypočítá vynásobením výsledku faktorem 6,25.

Složení bílkovin. Stanoví se zónovou elektroforézou (*2.2.31*) za použití proužků vhodného celulosoacetatového gelu jako nosiče a *tlumivého roztoku barbitalového o pH 8,6 (1)* jako elektrolytu.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby koncentrace imunoglobulinu byla 30 g/l.

Porovnávací roztok. Lidský imunoglobulin pro elektroforézu BRP se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby koncentrace bílkovin byla 30 g/l.

Na proužek se nanese 4,0 μl zkoušeného roztoku jako pruh 10 mm nebo se nanese 0,4 μl na milimetr, jsou-li použity užší proužky. Stejným způsobem se na jiný proužek nanese porovnávací roztok. Nechá se působit takové elektrické pole, aby se pruh albuminu normálního lidského séra, nanesený na kontrolní proužek, posunul alespoň o 30 mm. Proužek se 5 min barví *černí amido 10B RS*. Odbarvení se provede směsí 10 objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a 90 objemových dílů *methanolu R* tak, aby došlo k odbarvení pozadí. Transparence pruhů se vyvolá směsí objemových dílů *kyseliny octové ledové R* a *methanolu R* (19 + 81). Změří se absorbance pruhů při 600 nm na přístroji, který dává lineární odpověď v rozsahu celého měření. Stanoví se výsledek jako průměr ze tří měření z každého proužku. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku má nejvýše 5 % bílkovin mobilitu odlišnou od hlavního pásu. Tuto hodnotu nelze použít, je-li k přípravku přidán albumin jako stabilizátor; u takových přípravků se zkouška na složení bílkovin provádí při výrobě před přidáním stabilizátoru. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže na elektroforeogramu porovnávacího roztoku je podíl bílkovin hlavního pásu v mezích uvedených v příbalovém letáku referenčního přípravku.

Rozdělení podle molekulární velikosti. Stanovuje se kapalinovou chromatografií (*2.2.29*)

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se rozpustí v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) na koncentraci vhodnou pro použitý chromatografický systém. Zpravidla je tato koncentrace v rozmezí 4 g/l až 12 g/l a vstřikuje se 50 μg až 600 μg bílkovin.

Porovnávací roztok. Lidský imunoglobulin BRP se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na stejnou koncentraci bílkovin jako u zkoušeného roztoku.

Chromatografický postup se obvykle provede za použití:

- kolony délky 0,6 m a vnitřního průměru 7,5 mm naplněné *silikagelem hydrofilním pro chromatografii R*,
- mobilní fáze s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min, kterou je roztok obsahující v litru: 4,873 g *hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu R*, 1,741 g *dihydrogenfosforečnanu sodného monohydrátu R*, 11,688 g *chloridu sodného R* a 50 mg *azidu sodného R*,
- spektrofotometrického detektoru, 280 nm.

Na chromatogramu porovnávacího roztoku odpovídá hlavní pík monomeru IgG a pík odpovídající dimeru má relativní retenční čas asi 0,85, vztaženo k monomeru. Píky na chromatogramu zkoušeného roztoku se porovnají s chromatogramem porovnávacího roztoku. Každý pík s retenčním časem kratším, než je retenční čas dimeru, odpovídá polymerům a agregátům.

Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže relativní retenční čas píků monomeru a dimeru se shoduje s odpovídajícími píky na chromatogramu porovnávacího roztoku a je 1 ± 0,02; součet ploch píků odpovídajících monomeru a dimeru je nejméně 90 % celkové plochy píků a plocha píků odpovídajících polymerům a agregátům je nejvýše 3 % celkové plochy píků. Tento požadavek se nevztahuje na přípravky, u nichž je přidán albumin jako stabilizátor; u přípravků stabilizovaných albuminem se zkouška rozdělení podle molekulární velikosti provádí při výrobě před přidáním stabilizátoru.

Antikomplementární účinnost (*2.6.17*). Spotřeba komplementu je nejvýše 50 % (1 CH_{50} na miligram imunoglobulinu).

Aktivátor prekalikreinu (*2.6.15*). Nejvýše 35 m.j. v mililitru, počítáno na roztok obsahující 30 g imunoglobulinu v litru.

Hemaglutininy anti-A a anti-B (*2.6.20*). Provedou se zkoušky na hemaglutininy anti-A a anti-B. Obsahuje-li zkoušený přípravek více než 30 g imunoglobulinu v litru, zředí se na tuto koncentraci před přípravou ředění pro tuto zkoušku. Ředění 1 : 64 nevykazuje aglutinaci.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %; zkouší se u lyofilizovaných přípravků s nejméně 0,500 g zkoušené látky.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně objem odpovídající 0,5 g imunoglobulinu, ale nejvýše 10 ml na kilogram tělesné hmotnosti.

Protilátky proti povrchovému antigenu hepatitidy B. Nejméně 0,5 m.j. na gram imunoglobulinu, stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Uchovávání

Tekutý přípravek se uchovává v bezbarvých skleněných obalech, chráněn před světlem, při teplotě uvedené v označení. Lyofilizovaný přípravek se uchovává v bezbarvých skleněných obalech ve vakuu nebo v atmosféře inertního plynu, chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující 25 °C.

Označování

V označení obalu se uvede:
- u tekutého přípravku jeho objem v obalu a obsah bílkovin vyjádřený v gramech na litr,
- u lyofilizovaných přípravků množství bílkovin v obalu,
- způsob podání,
- podmínky uchovávání,
- doba použitelnosti,
- u lyofilizovaných přípravků název nebo složení a objem tekutiny k rekonstituci, jež se má přidat,
- rozdělení podtříd imunoglobulinu G obsažených v přípravku,
- kde je to vhodné, množství albuminu přidaného jako stabilizátor,
- nejvyšší obsah imunoglobulinu A.

Immunoglobulinum humanum rabicum

Lidský imunoglobulin proti vzteklině

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště immunoglobulin G. Přípravek je určen pro intramuskulární podání. Vyrábí se z plazmy dárců imunizovaných proti vzteklině. Obsahuje specifické protilátky neutralizující rabický virus. Může se přidat normální lidský imunoglobulin odpovídající článku *Immunoglobulinum humanum normale*.

Přípravek vyhovuje požadavkům uvedeným v článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním dávky imunoglobulinu potřebné k neutralizaci infekčnosti suspenze rabického viru s dávkou referenčního přípravku, kalibrovaného v mezinárodních jednot-

kách, potřebnou k dosažení téhož stupně neutralizace (*2.7.1* Imunochemické metody). Zkouška se provádí na citlivých buněčných kulturách a přítomnost viru, který není zneutralizován, se prokáže imunofluorescencí.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti rabickému viru obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu lidského imunoglobulinu proti vzteklině. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Zkouška se provede na vhodných citlivých buňkách. Obvykle se používají buňky buněčné linie BHK 21, rostoucí v médiu popsaném dále, mezi 18. a 30. pasáží od ATCC inokula. Buňky se sklízejí po 2 až 4 dnech růstu, uvolňují se trypsinem a připraví se suspenze obsahující 500 000 buněk v mililitru (buněčná suspenze). Je-li třeba, 10 min před použitím suspenze se přidá 10 µg *diethylaminoethyldextranu R* na mililitr ke zvýšení citlivosti buněk.

Použije se stálý virový kmen rostoucí na citlivých buňkách, jako je např. kmen CVS viru rabies adaptovaný na růst na buňkách linie BHK 21 (inokulační virová suspenze). Metodou popsanou dále se stanoví titr inokulační virové suspenze.

Připraví se sériová ředění virové suspenze. Do komůrek na sklech pro tkáňové kultury (8 komůrek na sklo) se nakape po 0,1 ml každého ředění a 0,1 ml média a přidá se 0,2 ml buněčné suspenze. Inkubuje se 24 h v atmosféře oxidu uhličitého při 37 °C. Po fixaci a imunofluorescenčním barvení se skla vyhodnotí. Stanoví se konečný bod titrace inokulační virové suspenze a připraví se pracovní ředění viru, které v 0,1 ml obsahuje 100 $CCID_{50}$.

Pro každou zkoušku se ověří množství použitého viru provedením kontrolní titrace: z ředění odpovídajícího 100 $CCID_{50}$ v 0,1 ml se připraví tři desetinásobná ředění. Po 0,1 ml každého ředění se nakape do čtyř komůrek obsahujících 0,1 ml média a přidá se po 0,2 ml buněčné suspenze. Zkouška je platná, když titr leží mezi 30 $CCID_{50}$ a 300 $CCID_{50}$.

Referenční přípravek se zředí neobohaceným médiem na koncentraci 2 m.j. v mililitru (zásobní referenční ředění; uchovává se při teplotě nižší než -80 °C). Připraví se dvě vhodná předředění (1 : 8 a 1 : 10) ze zásobního referenčního ředění tak, aby ředění referenčního přípravku, které sníží počet fluoreskujících polí o 50 %, bylo v rozsahu čtyř ředění na kultivačním skle. Přidá se 0,1 ml média do všech komůrek s výjimkou prvních ve dvou řadách, do kterých se případně přidá 0,2 ml ze dvou předředění zásobního referenčního ředění postupným přenášením 0,1 ml do dalších komůrek.

Zkoušený přípravek se zředí v poměru 1 : 100 neobohaceným médiem (zásobní ředění imunoglobulinu), aby se snížily na minimum chyby způsobené viskozitou neředěného přípravku. Připraví se tři vhodná předředění tak, aby ředění zkoušeného přípravku, které sníží počet fluoreskujících polí o 50 %, bylo v rozsahu čtyř ředění na kultivačním skle. Přidá se 0,1 ml média do všech komůrek s výjimkou prvních ve všech třech řadách, do nichž se přidá 0,2 ml ze tří předředění zásobního ředění imunoglobulinu. Připraví se řada dvojnásobných ředění postupným přenášením 0,1 ml do dalších komůrek.

Do všech komůrek obsahujících ředění referenčního přípravku a ředění zkoušeného přípravku se přidá 0,1 ml virové suspenze odpovídající 100 $CCID_{50}$ v 0,1 ml (pracovní ředění viru), protřepe se v ruce a inkubuje se 90 min v atmosféře oxidu uhličitého při 37 °C. Přidá se 0,2 ml buněčné suspenze, protřepe se v ruce a inkubuje 24 h v atmosféře oxidu uhličitého při 37 °C.

Po 24 h se odstraní médium a sejmou se plastové stěny. Buněčný monolayer se promyje *tlumivým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným o pH 7,4* a směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (20 + 80). Fixuje se 3 min směsí objemových dílů *vody R* a *acetonu R* (20 + 80) při -20 °C. Na skla se nanese *fluorescein-konjugované rabické antisérum R*. Ponechá se 30 min při 37 °C v prostoru s vysokou vlhkostí. Promyje se *tlumivým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným o pH 7,4* a usuší se. Vyšetří se dvacet polí v každé komůrce mikroskopem se zařízením

pro fluorescenci při zvětšení 250x. Zaznamenává se počet polí s nejméně jednou fluorescenčně označenou buňkou. Přepočítá se zkoušená dávka použitá při titraci viru a stanoví se ředění referenčního přípravku a ředění zkoušeného přípravku, které snižuje počet fluorescenčních polí o 50 %. Ředění se spočítá ze dvou nebo tří ředění společně použitím probitové analýzy. Zkoušku lze hodnotit pouze tehdy, jestliže statistická analýza nevykazuje signifikantní odchylku od křivky dávka - odpověď a odchylku od linearity nebo rovnoběžnosti.

Deklarovaná účinnost je nejméně 150 m.j. v mililitru. Stanovená účinnost není menší než deklarovaná účinnost a není větší než dvojnásobek deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvýše 125 %.

Médium pro růst buněk BHK 21

Komerčně vyráběná média, která mají pouze malé odchylky od dále uvedeného média, se mohou také použít.

chlorid sodný	6,4 g
chlorid draselný	0,40 g
chlorid vápenatý bezvodý	0,20 g
síran hořečnatý heptahydrát	0,20 g
dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát	0,124 g
glukosa monohydrát	4,5 g
dusičnan železitý nonahydrát	0,10 mg
L-argininiumchlorid	42,0 mg
L-cystin	24,0 mg
L-histidin	16,0 mg
L-isoleucin	52,0 mg
L-leucin	52,0 mg
L-lysiniumchlorid	74,0 mg
L-fenylalanin	33,0 mg
L-threonin	48,0 mg
L-tryptofan	8,0 mg
L-tyrosin	36,0 mg
L-valin	47,0 mg
L-methionin	15,0 mg
L-glutamin	0,292 g
i-inositol	3,60 mg
choliniumchlorid	2,0 mg
kyselina listová	2,0 mg
nikotinamid	2,0 mg
pantothenan vápenatý	2,0 mg
pyridoxaliumchlorid	2,0 mg
thiaminiumchlorid	2,0 mg
riboflavin	0,2 mg
červeň fenolová	15,0 mg
hydrogenuhličitan sodný	2,75 mg
voda	do 1000 ml

Médium se doplňuje:

sérum telecí fetální (30 min zahřáté na 56 °C)	10 %
trypton-fosforečnanová půda	10 %
sodná sůl benzylpenicilinu	60 mg/l
streptomycin	0,1 g/l

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale.*

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale.*
V označení na obalu se uvede počet mezinárodních jednotek v balení.

Immunoglobulinum humanum rubellae

Lidský imunoglobulin proti zarděnkám

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Přípravek je určen k nitrosvalovému podání. Získává se z plazmy, která obsahuje specifické protilátky proti viru zarděnek. Může se přidat normální lidský imunoglobulin.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním účinnosti zkoušeného přípravku ve zkoušce inhibice hemaglutinace s účinností referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního referenčního přípravku lidského séra proti zarděnkám. Hodnotu účinnosti mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Stanovená účinnost je nejméně 4500 m.j. v mililitru. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 50 % a nejvíce 200 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale.*

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale.*
V označení na obalu se uvede počet mezinárodních jednotek v mililitru.

Immunoglobulinum humanum tetanicum

Lidský tetanický imunoglobulin

Synonymum. Immunoglobulinum antitetanicum humanum

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Získává se z plazmy obsahující specifické protilátky proti toxinu vytvářenému mikroorganismem *Clostridium tetani*. Může se přidat normální lidský imunoglobulin.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců a minimálního obsahu celkových bílkovin.

Výroba

Při vývoji přípravku se má určit uspokojivý vztah mezi účinností stanovenou imunoanalýzou, jak je uvedeno ve zkoušce Stanovení účinnosti, a mezi účinností stanovenou následující zkouškou schopnosti neutralizovat toxin, provedenou na myších.

Schopnost neutralizovat toxin. Účinnost se stanoví porovnáním dávky potřebné na ochranu myší před paralytickým účinkem neměnné dávky tetanického toxinu s množstvím porovnávacího přípravku lidského tetanického imunoglobulinu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, které je potřebné k dosažení stejné ochrany.

Mezinárodní jednotka antitoxinu je specifická neutralizační účinnost proti tetanickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu lidského tetanického imunoglobulinu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace. *Lidský tetanický imunoglobulin BRP* je kalibrován v mezinárodních jednotkách porovnáním s mezinárodním standardem.

Výběr zvířat. Použijí se myši hmotnosti 16 g až 20 g.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví vhodnou metodou ze sterilního filtrátu *Cl. tetani* v tekuté živné půdě. Jako příklad jsou uvedeny dvě metody a může se použít i jiná vhodná metoda.

1. K filtrátu asi devítidenní kultury se přidají 1 až 2 objemové díly *glycerolu R* a uchovává se těsně pod 0 °C.
2. Vysráží se toxin přidáním *síranu amonného R* k filtrátu, sraženina se vysuší ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a uchovává v suchu buď v zatavených ampulkách, nebo ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*.

Stanovení zkušební dávky toxinu (Lp/10 dávka). Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,5 m.j. antitoxinu. Jestliže je toxin uchováván jako suchý, rozpustí se ve vhodném rozpouštědle. Připraví se směsi roztoků porovnávacího přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku porovnávacího přípravku, jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu a vhodnou tekutinou doplňující směsi na 5,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají chráněny před světlem. Z každé směsi se subkutánně vstříkne šesti myším po 0,5 ml a myši se pozorují 96 h. Myši s příznaky paralýzy se mohou utratit.

Zkušební dávka toxinu je ono množství, jež je obsaženo v 0,5 ml směsi s nejnižším obsahem toxinu, která přes jeho částečnou neutralizaci referenčním přípravkem je ještě schopna způsobit paralýzu všech šesti myší v průběhu pozorovací doby.

Stanovení účinnosti imunoglobulinu. Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,5 m.j. antitoxinu. Připraví se roztok zkušebního toxinu

ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo pět zkušebních dávek. Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku zkoušeného přípravku a vhodnou tekutinu doplňující směsi na 5,0 ml. Podobně se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a referenčního přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku referenčního přípravku s tím, že uprostřed řady je objem (2,0 ml), který obsahuje 1 m.j. imunoglobulinu a vhodnou tekutinou doplňující směsi na 5,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají chráněny před světlem. Z každé směsi se subkutánně vstříkne šesti myším po 0,5 ml a myši se pozorují 96 h. Myši s příznaky paralýzy se mohou utratit. Směs obsahující největší objem imunoglobulinu, který nestačí ochránit myši před paralýzou, obsahuje 1 m.j. Toto množství se použije k výpočtu účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže všechny myši, kterým byla vstříknuta směs s obsahem 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, mají příznaky paralýzy a všechny myši, kterým byla vstříknuta směs s vyšším obsahem referenčního přípravku, příznaky paralýzy nemají.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním protilátkového titru zkoušeného přípravku s referenčním přípravkem kalibrovaným v mezinárodních jednotkách za použití imunoanalýzy vhodné citlivosti a specifity (*2.7.1*).

Lidský *tetanický imunoglubulin BRP* je kalibrován v mezinárodních jednotkách porovnáním s mezinárodním standardem.

Deklarovaná účinnost je nejméně 100 m.j. tetanického antitoxinu v mililitru. Stanovená účinnost není menší než deklarovaná účinnost. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je 80 % až 125 %.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

Označování

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

V označení na obalu se uvede množství mezinárodních jednotek v balení.

Immunoglobulinum humanum varicellae

Lidský imunoglobulin proti planým neštovicím

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek obsahující imunoglobuliny, zvláště imunoglobulin G. Přípravek je určen k nitrosvalovému podání. Získává se z plazmy vybraných dárců obsahující protilátky proti *Herpesvirus varicellae.* Může se přidat normální lidský imunoglobulin.

Vyhovuje článku *Immunoglobulinum humanum normale* s výjimkou minimálního počtu dárců, minimálního celkového obsahu bílkovin, a je-li schváleno autoritou, s výjimkou zkoušky na protilátky proti povrchovému antigenu hepatitidy B.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním titru protilátek zkoušeného přípravku s titrem protilátek referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách. Pro stanovení se použije imunoanalýza vhodné citlivosti a specificity (*2.7.1* Imunochemické metody).

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu lidského imunoglobulinu proti planým neštovicím. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Deklarovaná účinnost je nejméně 100 m.j. v mililitru. Stanovená účinnost není menší než deklarovaná účinnost. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 80 % a nejvýše 125 %.

Uchovávání

Viz článek *Immunoglobulinum humanum normale*.

Označování

Viz článek *Immunoglobulinu humanum normale*.

V označení na obalu se uvede počet mezinárodních jednotek v nádobce.

Immunoserum botulinicum

Imunní sérum proti botulinickému toxinu

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat toxiny, které vytváří *Clostridium botulinum* typu A, B nebo E, nebo jejich směsi.

Výroba

Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců, kteří byli imunizováni proti toxinům *Cl. botulinum* typu A, B nebo E.

Zkouška totožnosti

Specificky neutralizuje toxiny typů *Cl. botulinum* uvedené v označení a činí je neškodnými pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum*.

Stanovení účinnosti

Nejméně 500 m.j. antitoxinu v mililitru pro typy A a B a nejméně 50 m.j. antitoxinu v mililitru pro typ E.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné na ochranu myší před letálním účinkem neměnné zkušební dávky botulinického toxinu s dávkou referenčního přípravku

botulinického antitoxinu potřebnou k dosažení stejné ochrany. Pro toto srovnání je zapotřebí referenční přípravek každého typu botulinického antitoxinu, kalibrovaný v mezinárodních jednotkách, a vhodné přípravky botulinických toxinů, které se používají jako zkušební toxiny. Účinnost každého zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu ke specifickému referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebních toxinů.

Mezinárodní jednotky antitoxinu jsou specifické neutralizační účinnosti proti botulinickému toxinu typu A, B a E obsažené v deklarovaných množstvích mezinárodních standardů, které obsahují vysušená koňská séra proti typům A, B a E. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Výběr zvířat. Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl v hmotnosti mezi nejlehčí a nejtěžší nepřesáhl 5 g.

Příprava zkušebních toxinů. Výstraha: Botulinický toxin je extrémně toxický; při jakékoliv manipulaci je nutno zachovávat mimořádnou opatrnost. Připraví se toxiny typu A, B a E ze sterilních filtrátů asi sedmidenních kultur *Cl. botulinum* typu A, B a E v tekuté živné půdě. K filtrátu se přidají dva objemy glycerolu, je-li třeba, zahustí se dialýzou proti glycerolu a uchovávají se při nebo slabě pod 0 °C.

Výběr zkušebních toxinů. Zkušební toxiny od každého typu se vyberou podle stanovení dávek L+/10 a LD 50; doba pozorování je 96 h. Zkušební toxiny obsahují nejméně 1000 LD 50 v jedné L+/10 dávce.

Stanovení zkušebních dávek toxinů (L+/10 dávka). Připraví se roztoky referenčních přípravků ve vhodné tekutině tak, aby každý obsahoval 0,25 m.j. antitoxinu v 1 ml. Postupně se pomocí připravených roztoků stanoví zkušební dávky jednotlivých zkušebních toxinů.

Připraví se směsi roztoků referenčních přípravků a zkušebních toxinů tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku, jeden z odstupňovaných objemů zkušebního toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Z každé směsi se intraperitoneálně vstříkne čtyřem myším po 1,0 ml a myši se pozorují 96 h.

Zkušební dávka toxinu je ono množství, jež je obsaženo v 1,0 ml směsi s nejnižším obsahem toxinu, které přes jeho částečnou neutralizaci referenčním přípravkem je ještě schopno vyvolat smrt všech čtyř myší v průběhu pozorovací doby.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Připraví se roztoky referenčních přípravků ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,25 m.j. antitoxinu. Připraví se roztoky všech zkušebních toxinů ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 2,5 zkušební dávky.

Účinnost zkoušeného přípravku se určí postupným použitím každého roztoku toxinu a odpovídajícího referenčního přípravku. Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z odstupňovaných objemů zkoušeného přípravku a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Podobně se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a referenčního přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, dále jeden z odstupňovaných objemů roztoku referenčního přípravku s tím, že uprostřed řady je objem (2,0 ml), který obsahuje 0,5 m.j., a zbytek do 5 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě chráněny před světlem. Z každé směsi se intraperitoneálně vstříkne čtyřem myším po 1,0 ml a myši se pozorují 96 h. Směs obsahující největší objem antitoxinu, který nestačí ochránit myši před uhynutím, obsahuje 0,5 m.j. Toto množství se použije k výpočtu účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, pokud uhynou všechny myši, kterým byly vstříknuty směsi obsahující 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, a přežijí ty, kterým byly vstříknuty směsi obsahující více referenčního přípravku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*
V označení se uvede typ *Cl. botulinum*, jehož toxin je přípravkem neutralizován.

Immunoserum clostridii novyi alpha ad usum veterinarium

Imunní sérum proti toxinu alfa Clostridia novyi pro veterinární použití

Je to přípravek obsahující globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium novyi* (starší názvosloví: *Clostridium oedematiens*). Je to sérum nebo přípravek získaný ze séra zvířat imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. novyi.*

Zkouška totožnosti

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. novyi* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Účinnost nativního séra je nejméně 750 m.j./ml u koňského séra a nejméně 250 m.j./ml u séra skotu.

Účinnost koncentrovaného séra je nejméně 1500 m.j./ml u koňského séra a nejméně 500 m.j./ml u séra skotu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti alfa-toxinu *Cl. novyi* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáváním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné zkušební dávky alfa-toxinu *Cl. novyi* s množstvím referenčního přípravku imunního séra proti alfa-toxinu *Cl. novyi*, které je nezbytné k dosažení stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrován v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek alfa-toxinu *Cl. novyi*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu asi pětidenní kultury *Cl. novyi* typ B v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Toxin se vybere podle stanovení dávek L+/10 a LD_{50} na myších; doba pozorování je 72 h. Vhodný alfa-toxin obsahuje nejméně jednu L+/10 dávku v 0,050 mg a nejméně 10 LD_{50} v každé L+/10 dávce.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Referenční přípravek se zředí vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval 1 m.j. Zkušební toxin se rozpustí a zředí tak, aby 1 ml roztoku obsahoval přesně známé množství, např. 1 mg. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m.j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se uchovávají 60 min při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se nitrosvalově nebo podkožně vstříkne dávka 0,2 ml a myši se pozorují 72 h. Pokud všechny myši uhynou, je v 0,2 ml směsi nadbytek toxinu vzhledem ke zkušební dávce. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu v 0,2 ml směsi nižší, než je zkušební dávka. Obdobně se připraví další čerstvé směsi tak, aby 2,0 ml směsi obsahovaly 1,0 ml referenčního přípravku (1 m.j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíly mezi sousedními objemy jsou nejvýše 20 % a řada ředění přesahuje předpokládaný mezní bod. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě.

Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé nitrosvalově nebo podkožně vstříkne 0,2 ml. Myši se pozorují 72 h. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky jednotlivých zkoušek se směsmi stejného složení se sečtou. Tím se získá konečný výsledek představující mortalitu způsobenou směsí určitého složení. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,2 ml té směsi, která způsobila úhyn poloviny celkového počtu myší.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.

Předběžná zkouška: Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 1 ml obsahoval desetinásobek zkušební dávky. Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou a směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé nitrosvalově nebo podkožně vstříkne 0,2 ml, a myši se pozorují 72 h. Pokud žádná myš neuhyne, 0,2 ml směsi obsahuje více než 0,1 m.j. Pokud uhynou všechny myši, 0,2 ml směsi obsahuje méně než 0,1 m.j.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku (v řadě se stoupající objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje předpokládaný mezní bod stanovený v předběžné zkoušce). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi, které v objemu 2,0 ml obsahují 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a postupuje se stejně jako v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která v 0,2 ml obsahuje 0,1 m.j., je ta směs, která způsobí úhyn stejného nebo téměř stejného počtu myší jako směs referenčního přípravku obsahující 0,1 m.j. v 0,2 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) jsou stanoveny takto:

- 85 % a 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5 % a 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku,
- 93 % a 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium.*
V označení obalu se uvede, zda přípravek obsahuje nativní nebo koncentrované sérum.

Immunoserum clostridii perfringentis beta ad usum veterinarium

Imunní sérum proti toxinu beta Clostridia perfringens pro veterinární použití

Je to přípravek obsahující hlavně globuliny schopné specificky neutralizovat beta-toxin, který vytváří *Clostridium perfringens* (typ B a typ C). Je to sérum nebo přípravek ze séra zvířat imunizovaných proti beta-toxinu *Cl. perfringens*.

Zkouška totožnosti

Specificky neutralizuje beta-toxin vytvořený *Cl. perfringens* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Účinnost nativního séra je nejméně 1000 m.j./ml u koňského séra a nejméně 250 m.j./ml u séra skotu.

Účinnost koncentrovaného séra je nejméně 3000 m.j./ml u koňského séra a nejméně 1000 m.j./ml u séra skotu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti beta-toxinu *Cl. perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáváním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné zkušební dávky beta-toxinu *Cl. perfringens* s množstvím referenčního přípravku imunního séra proti beta-toxinu *Cl. perfringens*, které je nezbytné k dosažení stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrován v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek beta-toxinu *Cl. perfringens*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu čerstvé kultury *Cl. perfringens* typu B nebo C v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Zkušební toxin se vybere podle stanovení dávek L+ a LD_{50} na myších, doba pozorování je 72 h. Vhodný beta-toxin obsahuje nejméně jednu L+ dávku v 0,2 mg a nejméně 25 LD_{50} v každé L+ dávce.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Referenční přípravek se zředí vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval 5 m.j. Zkušební toxin se rozpustí a zředí tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (10 m.j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě.

Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne dávka 0,5 ml a pozorují se 72 h. Pokud všechny myši uhynou, je v 0,5 ml směsi nadbytek toxinu vzhledem ke zkušební dávce. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu v 0,5 ml směsi nižší, než je zkušební dávka. Obdobně se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (10 m.j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíly mezi sousedními objemy jsou nejvýše 20 % a řada ředění přesahuje předpokládaný mezní bod. Směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml. Myši se pozorují 72 h. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky jednotlivých zkoušek se směsmi stejného složení se sečtou. Tím se získá konečný výsledek představující mortalitu způsobenou směsí určitého složení. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobila úhyn poloviny celkového počtu myší.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.

Předběžná zkouška: Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky. Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou a směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml, a myši se pozorují 72 h. Pokud žádná myš neuhyne, 0,5 ml směsi obsahuje více než 1 m.j. Pokud uhynou všechny myši, 0,5 ml směsi obsahuje méně než 1 m.j.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku (v řadě se stoupající objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje předpokládaný mezní bod stanovený v předběžném testu). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi, které v objemu 5,0 ml obsahují 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a postupuje se stejně jako v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 1 m.j. v 0,5 ml, je ta směs, která způsobí úhyn stejného nebo téměř stejného počtu myší jako směs s referenčním přípravkem obsahující 1 m.j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) jsou stanoveny takto:

- 85% a 114%, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5% a 109%, použila-li se čtyři zvířata na dávku,
- 93% a 108%, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium.*
V označení se uvede, zda přípravek obsahuje nativní nebo koncentrované sérum.

Immunoserum clostridii perfringentis epsilon ad usum veterinarium

Imunní sérum proti toxinu epsilon Clostridia perfringens pro veterinární použití

Je to přípravek obsahující globuliny schopné specificky neutralizovat toxin epsilon, který vytváří *Clostridium perfringens* typu D. Je to sérum nebo přípravek ze séra zvířat imunizovaných proti toxinu epsilon *Cl. perfringens*.

Zkouška totožnosti

Specificky neutralizuje epsilon-toxin vytvořený *Cl. perfringens* typu D a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Účinnost nativního séra je nejméně 120 m.j./ml u koňského séra a nejméně 100 m.j./ml u séra skotu.

Účinnost koncentrovaného séra je nejméně 300 m.j./ml u koňského séra a 150 m.j./ml u séra skotu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti epsilon-toxinu *Cl. perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáváním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné zkušební dávky toxinu-epsilon *Cl. perfringens* s množstvím referenčního přípravku imunního séra proti toxinu-epsilon *Cl. perfringens*, které je nezbytné k dosažení stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrován v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek epsilon-toxinu *Cl. perfringens*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu čerstvé kultury *Cl. perfringens* typu D v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Zkušební toxin se vybere podle stanovení dávek L+/10 a LD_{50} na myších, doba pozorování je 72 h. Vhodný epsilon-toxin obsahuje nejméně jednu dávku L+/10 v 0,005 mg a nejméně 20 LD_{50} v každé dávce L+/10.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Referenční přípravek se zředí vhodnou tekutinou tak, aby 1 ml obsahoval 0,5 m.j. Zkušební toxin se rozpustí a zředí tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 1 mg. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m.j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g. Každé myši se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne dávka 0,5 ml a pozorují se 72 h. Pokud všechny myši uhynou, je v 0,5 ml směsi nadbytek toxinu vzhledem ke zkušební dávce. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu v 0,5 ml směsi nižší, než je zkušební dávka.

Obdobně se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m.j.) a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu. Rozdíly mezi sousedními objemy jsou nejvýše 20 % a řada ředění přesahuje předpokládaný mezní bod. Směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml. Myši se pozorují 72 h. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky jednotlivých zkoušek se směsmi stejného složení se sečtou. Tím se získá konečný výsledek představující mortalitu způsobenou směsí určitého složení. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobila úhyn poloviny celkového počtu myší.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.

Předběžná zkouška: Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky. Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou a směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, z nichž se každé intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml, a myši se pozorují 72 h. Pokud žádná myš neuhyne, 0,5 ml směsi obsahuje více než 0,1 m.j. Pokud uhynou všechny myši, 0,5 ml směsi obsahuje méně než 0,1 m.j.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku (v řadě se stoupající objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje předpokládaný mezní bod stanovený v předběžném testu). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi, které v objemu 5,0 ml obsahují 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Směsi se 30 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a postupuje se stejně jako v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m.j. v 0,5 ml, je ta směs, která způsobí úhyn stejného nebo téměř stejného počtu myší jako směs s referenčním přípravkem obsahující 0,1 m.j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) jsou stanoveny takto:
- 85% a 114%, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5% a 109%, použila-li se čtyři zvířata na dávku,
- 93% a 108%, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium*.
V označení obalu se uvede, zda přípravek obsahuje nativní nebo koncentrované sérum.

Immunoserum contra venena viperarum europaearum

Imunní sérum proti jedu zmijí evropských

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné neutralizovat jed jednoho nebo více druhů zmijí. Získává se frakcionací sér zvířat imunizovaných proti jedu nebo jedům zmijí.

Zkouška totožnosti

Neutralizuje jed druhů *Vipera ammodytes* nebo *Vipera aspis* nebo *Vipera berus* nebo *Vipera ursinii* nebo směs těchto jedů uvedenou v označení a činí je neškodnými pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum.*

Stanovení účinnosti

Zkoušený přípravek obsahuje v mililitru dostatek antitoxických globulinů k neutralizaci nejméně 100 myších LD_{50} jedu *Vipera ammodytes* nebo *Vipera aspis* a nejméně 50 myších LD_{50} jedů ostatních druhů zmijí.

Účinnost se určí odhadem dávky nutné k ochraně myší před letálními účinky neměnné zkušební dávky jedu příslušného druhu zmije.

Výběr zkušebních jedů. Používají se jedy, které mají normální fyzikálně-chemické, toxikologické a imunologické vlastnosti jedů jednotlivých druhů zmijí. Pokud možno se lyofilizují a uchovávají v temnu při (5 ± 3) °C.

Zkušební jed se vybere podle stanovení LD_{50} pro myši, doba pozorování je 48 h.

Stanovení zkušební dávky jedu. Připraví se řada postupných ředění rozpuštěného jedu v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) nebo v jiném izotonickém roztoku tak, aby prostřední ředění obsahovalo předpokládanou LD_{50} v 0,25 ml. Naředí se dále stejným objemem téhož ředidla. Použijí se nejméně čtyři myši hmotnosti 18 g až 20 g pro každé ředění a každé z nich se intravenózně vstříkne 0,5 ml. Myši se pozorují 48 h a zaznamenává se počet uhynulých. LD_{50} se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Rozpuštěný zkušební toxin se naředí tak, aby v 0,25 ml byla obsažena zkušební dávka 5 LD_{50}.

Připraví se sériové ředění zkoušeného přípravku v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) nebo jiném izotonickém roztoku geometrickou řadou s faktorem 1,5 až 2,5. Použije se dostatečný počet a rozptyl ředění tak, aby bylo možno vytvořit křivku úmrtnosti mezi 20% a 80% úmrtností a provést odhad statistické odchylky.

Směsi se připraví tak, že 5 ml každé směsi obsahuje 2,5 ml jednoho z ředění zkoušeného přípravku a 2,5 ml roztoku zkušebního jedu. Směsi se 30 min inkubují ve vodní lázni při 37 °C. Pak se intravenózně vstříkne z každé směsi po 0,5 ml nejméně šesti myším o hmotnosti 18 g až 20 g. Myši se pozorují 48 h a zaznamenává se počet uhynulých. Obvyklými statistickými metodami se vypočítá ED_{50}. Zároveň se výše uvedenou metodou ověří hodnota LD_{50} ve zkušební dávce jedu. Účinnost antiséra se vypočte ze vzorce:

$$(T_v - 1)/ED_{50} ,$$

v němž značí:

T_v - počet LD_{50} ve zkušební dávce jedu.

V každé myší dávce směsi jedu s antisérem na konci řady je obsažena 1 LD_{50} jedu, která není neutralizována antisérem, a ta způsobí smrt 50 % myší, kterým byla směs podána. Množství jedu neutralizované antisérem je tedy o 1 LD_{50} menší než celkové množství obsažené v každé myší dávce. Tudíž, protože je účinnost antiséra definována spíše jako hodnota LD_{50} jedu, která je antisérem neutralizována, než jako hodnota LD_{50} v jedné myší dávce, je i ve výrazu pro výpočet účinnosti vhodnější T_v - 1 než T_v.

Nebo je možno vypočítat počet miligramů zkušebního jedu, který je neutralizován 1 ml nebo jiným určeným objemem zkoušeného přípravku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede jed nebo jedy, proti kterým je antisérum účinné.

Varování: Z důvodu alergenních vlastností zmijích jedů je třeba vhodnými opatřeními zabránit inhalaci jedu v práškové formě.

Immunoserum diphthericum

Imunní sérum proti difterickému toxinu

Synonymum. Immunoglobulinum antidiphthericum

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat toxin, který vytváří *Corynebacterium diphtheriae*.

Výroba

Získává se frakcionací séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti difterickému toxinu.

Zkoušky totožnosti

Specificky neutralizuje toxin vytvořený *C. diphtheriae* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum*.

Stanovení účinnosti

Nejméně 1000 m.j. antitoxinu v mililitru přípravku získaného z koňského séra a nejméně 500 m.j. antitoxinu v mililitru přípravku získaného ze séra jiných savců.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat nebo králíků před erytrogenním účinkem neměnné zkušební dávky difterického toxinu s dávkou referenčního přípravku difterického imunního séra, která je nezbytná k dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je zapotřebí vhodný referenční přípravek kalibrovaný v mezinárodních jednotkách a vhodný přípravek zkušebního difterického toxinu. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu.

Mezinárodní jednotka antitoxinu je specifická neutralizační účinnost proti difterickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví z kultur *C. diphtheriae* v tekuté živné půdě. Filtrací kultury se získá sterilní toxický filtrát, který se uchovává při 4 °C.

Výběr zkušebního toxinu. Zkušební toxin se vybere podle stanovení dávky lr/100 a minimální reakční dávky u morčat a králíků; doba pozorování je 48 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje nejméně 200 nejmenších reakčních dávek v jedné lr/100 dávce.

Nejmenší reakční dávka. Je to nejmenší množství toxinu, které po intrakutánním vstřiknutí morčatům nebo králíkům vyvolá do 48 h malou charakteristickou reakci v místě vpichu.

Zkušební toxin se před stanovením antitoxinu nechá stát několik měsíců. Během této doby se snižuje jeho toxicita a může se zvýšit lr/100 dávka. V častých intervalech se zjišťuje nejmenší reakční dávka a lr/100 dávka. Když se pokusně prokáže, že lr/100 dávka je konstantní, je zkušební toxin připraven k užití a může být používán po dlouhou dobu. Uchovává se ve tmě při 0 °C až 5 °C. Jeho sterilita se zajistí přidáním toluenu nebo jiného protimikrobního konzervačního prostředku, který nezpůsobí rychlý pokles specifické toxicity.

Stanovení zkušební dávky toxinu (lr/100 dávka). Referenční přípravek se ve vhodné tekutině zředí tak, aby 1 ml obsahoval 0,1 m.j. antitoxinu.

Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů zkušebního toxinu, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 15 min až 60 min uchovají při pokojové teplotě chráněny před světlem. Pro každou směs se použijí dvě zvířata, z nichž se každému intrakutánně vstříkne 0,2 ml do oholeného nebo depilovaného boku, a pozorují se 48 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,2 ml té směsi, která byla připravena s nejmenším množstvím toxinu, jež bylo schopno vyvolat, bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem, malou, ale charakteristickou erytematózní lézi v místě vpichu.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 0,125 m.j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 zkušební dávky.

Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. K doplnění se použije vhodná tekutina. Dále se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a roztoku referenčního přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 0,8 ml obsahující 0,1 m.j., a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 15 min až 60 min uchovávají při pokojové teplotě chráněny před světlem. Pro každou směs se použijí dvě zvířata, z nichž se každému intrakutánně vstříkne 0,2 ml do oholeného nebo depilovaného boku, a pozorují se 48 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání morčata před erytematózním účinkem toxinu, obsahuje 0,1 m.j. Toto množství se použije pro výpočet účinnosti v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže na všech místech vpichu po vstříknutí směsi obsahující 0,8 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku jsou erytematózní léze a všechna místa vpichu, do nichž byly vstříknuty směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, jsou bez lézí.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Immunoserum erysipelatis suillae

Imunní sérum proti července prasat

Je to přípravek obsahující globuliny, které mají schopnost specificky neutralizovat virulentní kulturu *Erysipelothrix rhusiopathiae (E. insidiosa)*. Obsahuje sérum nebo přípravek ze séra koní imunizovaných proti vhodnému kmeni *E. rhusiopathiae*.

Zkoušky totožnosti

Specificky neutralizuje virulentní kulturu *E. rhusiopathiae* a činí ji neškodnou pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum veterinarium* a následující dodatečné zkoušce:

Bezpečnost. Dvěma vnímavým prasatům se subkutánně vstříkne po dvojnásobku doporučené dávky a zvířata se pozorují 7 dnů. Neprojeví se žádná lokální ani celková reakce.

Stanovení účinnosti

Účinnost je nejméně 100 m.j./ml.

Mezinárodní jednotka je specifická ochranná účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu séra proti července prasat (anti-N), který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáváním dávky potřebné k ochraně myší před účinkem virulentní kultury *E. rhusiopathiae* s dávkou referenčního přípravku imunního séra, která je nezbytná k dosažení stejné ochrany. Referenční přípravek je kalibrován v mezinárodních jednotkách. Pro toto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek virulentní kultury *E. rhusiopathiae*, který se použije k čelenži. Účinnost vzorku zkoušeného přípravku se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku za použití virulentní čelenžní kultury.

Použijí se zdravé bílé myši hmotnosti 17 g až 20 g z jednoho chovu. Rozdělí se nejméně do šesti skupin po deseti myších. Referenční přípravek se podá nejméně třem skupinám a zkoušený přípravek také nejméně třem skupinám. Jedna skupina o deseti myších se použije ke kontrole čelenžního kmene. K čelenži se použije dostatečné množství virulentní kultury ve fázi aktivního růstu, kultura se může podle potřeby ředit (aby se dosáhlo dávky, která způsobuje úhyn myší za 2 až 5 dnů). Připraví se nejméně tři ředění v geometrické řadě referenčního i zkoušeného přípravku. Jako ředicí roztok se použije roztok *chloridu sodného R* (9 g/l). Doporučené dávky jsou 0,2 m.j. až 5,0 m.j. pro referenční přípravek i zkoušený přípravek. Všechna uvedená množství jsou obsažena v objemu 0,5 ml. Každé myši se subkutánně vstříkne ředění určené pro danou skupinu. Za 1 h se všechny myši včetně kontrol intraperitoneálně infikují čelenžním kmenem. Myši se pozorují 8 dnů a zaznamenávají se úhyny. Všechny kontrolní myši uhynou na infekci za 2 až 5 dnů po čelenži. Pomocí obvyklých statistických metod se vypočítá účinnost zkoušeného přípravku ve vztahu k účinnosti referenčního přípravku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede, že přípravek je vyroben z koňského séra.

Immunoserum gangraenicum (Clostridium novyi)

Monovalentní imunní sérum proti plynaté sněti (Clostridium novyi)

Synonymum. Immunoglobulinum antigangraenosum

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium novyi* (dřívější název: *Clostridium oedematiens)*. Získává se frakcionací séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. novyi*.

Zkoušky totožnosti

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. novyi* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum.*

Stanovení účinnosti

Nejméně 3750 m.j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před letálním účinkem neměnné zkušební dávky toxinu *Cl. novyi* s dávkou referenčního přípravku, která je nezbytná pro dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je zapotřebí referenční přípravek proti plynaté sněti (*Cl. novyi*) kalibrovaný v mezinárodních jednotkách antitoxinu a vhodný přípravek toxinu *Cl. novyi*. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti toxinu *Cl. novyi* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného koňského imunního séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Výběr zvířat. Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl mezi nejlehčí a nejtěžší nepřekročil 5 g.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu z asi pětidenní kultury *Cl. novyi* v tekuté živné půdě. Filtrát se smíchá se síranem amonným, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a uchovává v suchu.

Výběr zkušebního toxinu. Zkušební toxin se vybere podle stanovení L+ dávky a LD_{50} u myší, doba pozorování je 72 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje L+ dávku v 0,5 mg nebo v menším množství a nejméně 25 LD_{50} v každé L+ dávce.

Stanovení zkušební dávky toxinu (L+ dávka). Referenční přípravek se zředí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 m.j. antitoxinu.

Zkušební toxin se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a roztoku zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 0,8 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, kterým se intramuskulárně vstříkne po 0,2 ml, a pozorují se 72 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,2 ml té směsi, která byla připravena s nejmenším množstvím toxinu, které ještě vyvolá bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem smrt všech šesti myší během sledované doby.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 m.j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 12,5 m.j. zkušební dávky.

Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku, a zbytek do 2,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Dále se připraví směsi roztoků zkušebního

toxinu a referenčního přípravku tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 0,8 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 0,8 ml, který obsahuje 10 m.j., a vhodnou tekutinou se doplní do celkového objemu 2,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, z nichž se každé intramuskulárně vstříkne po 0,2 ml, a pozorují se 72 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání myši před uhynutím, obsahuje 10 m.j. Toto množství se použije pro výpočet účinnosti v mezinárodních jednotkách antitoxinu v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechny myši, kterým byly vstříknuty směsi obsahující 0,8 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, uhynou a všechny, kterým byly vstříknuty směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, přežijí.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Immunoserum gangraenicum (Clostridium perfringens)

Monovalentní imunní sérum proti plynaté sněti (Clostridium perfringens)

Synonymum. Immunoglobulinum antigangraenosum

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium perfringens*. Získává se frakcionací séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. perfringens*.

Zkoušky totožnosti

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. perfringens* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum.*

Stanovení účinnosti

Nejméně 1500 m.j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před letálním účinkem neměnné zkušební dávky toxinu *Cl. perfringens* s dávkou referenčního přípravku, která je nezbytná pro dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je zapotřebí referenční přípravek proti plynaté sněti (*Cl. perfringens*) kalibrovaný v mezinárodních jednotkách antitoxinu a vhodný přípravek toxinu *Cl. perfringens*. Účinnost zkušebního toxinu se

stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti toxinu *Cl. perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného koňského imunního séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Výběr zvířat. Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl mezi nejlehčí a nejtěžší nepřekročil 5 g.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu z asi pětidenní kultury *Cl. perfringens* v tekuté živné půdě. Filtrát se smíchá se síranem amonným, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje a uchovává v suchu.

Výběr zkušebního toxinu. Zkušební toxin se vybere podle stanovení L+ dávky a LD_{50} u myší, doba pozorování je 48 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje L+ dávku ve 4 mg nebo v menším množství a nejméně 20 LD_{50} v každé L+ dávce.

Stanovení zkušební dávky toxinu (L+ dávka). Referenční přípravek se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 m.j. antitoxinu.

Zkušební toxin se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 10 mg.

Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a roztoku zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, kterým se intravenózně vstříkne po 0,5 ml, a pozorují se 48 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml té směsi, která byla připravena s nejmenším množstvím toxinu, které ještě vyvolá bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem smrt všech šesti myší během sledované doby.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 m.j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkoušeného přípravku, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Dále se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a referenčního přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 2,0 ml, který obsahuje 10 m.j., a vhodnou tekutinou se doplní do celkového objemu 5,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, z nichž se každé intravenózně vstříkne po 0,5 ml, a pozorují se 48 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání myši před uhynutím, obsahuje 10 m.j. Toto množství se použije pro výpočet účinnosti v mezinárodních jednotkách antitoxinu v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechny myši, kterým byly vstříknuty směsi obsahující 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, uhynou a všechny, kterým byly vstříknuty směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, přežijí.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Immunoserum gangraenicum (Clostridium septicum)

Monovalentní imunní sérum proti plynaté sněti (Clostridium septicum)

Synonymum. Immunoglobulinum antigangraenosum

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny schopné specificky neutralizovat alfa-toxin, který vytváří *Clostridium septicum*. Získává se frakcionací séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti alfa-toxinu *Cl. septicum*.

Zkoušky totožnosti

Specificky neutralizuje alfa-toxin vytvořený *Cl. septicum* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum*.

Stanovení účinnosti

Nejméně 1500 m.j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před letálním účinkem neměnné zkušební dávky toxinu *Cl. septicum* s dávkou referenčního přípravku, která je nezbytná pro dosažení stejné ochrany. Pro toto porovnání je zapotřebí referenční přípravek proti plynaté sněti (*Cl. septicum*) kalibrovaný v mezinárodních jednotkách antitoxinu a vhodný přípravek toxinu *Cl. septicum*. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného přípravku se stanoví stejnou metodou ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti toxinu *Cl. septicum* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného koňského imunního séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Výběr zvířat. Používají se myši takových hmotností, aby rozdíl mezi nejlehčí a nejtěžší nepřekročil 5 g.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu z asi pětidenní kultury *Cl. septicum* v tekuté živné půdě. Filtrát se smíchá se síranem amonným, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a uchovává v suchu.

Výběr zkušebního toxinu. Zkušební toxin se vybere podle stanovení L+ dávky a LD_{50} u myší, doba pozorování je 72 h. Vhodný zkušební toxin obsahuje L+ dávku v 0,5 mg nebo v menším množství a nejméně 25 LD_{50} v každé L+ dávce.

Stanovení zkušební dávky toxinu (L+ dávka). Referenční přípravek se zředí ve vhodné tekutině tak, aby v 1 ml obsahoval 5 m.j. antitoxinu. Zkušební toxin se rozpustí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval přesně známé množství, např. 20 mg. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a roztoku zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z odstupňovaných objemů roztoku zkušebního toxinu, a zbytek do 5,0 ml se doplní vhodnou tekutinou. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, kterým se intravenózně vstříkne po 0,5 ml, a pozorují se 72 h.

Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v 0,5 ml té směsi, která byla připravena s nejmenším množstvím toxinu, které ještě vyvolá bez ohledu na částečnou neutralizaci referenčním přípravkem smrt všech šesti myší během sledované doby.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Připraví se roztok referenčního přípravku ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 m.j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 5 zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkoušeného přípravku, a zbytek do 5 ml se doplní vhodnou tekutinou. Dále se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a referenčního přípravku tak, aby 5 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů referenčního přípravku, v jejímž středu je objem 2,0 ml, který obsahuje 10 m.j., a vhodnou tekutinou se doplní do celkového objemu 5,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Pro každou směs se použije šest myší, z nichž se každé intravenózně vstříkne po 0,5 ml, a pozorují se 72 h.

Směs, která obsahuje největší objem zkoušeného přípravku, který neochrání myši před uhynutím, obsahuje 10 m.j. Toto množství se použije pro výpočet účinnosti v mezinárodních jednotkách antitoxinu v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechny myši, kterým byly vstříknuty směsi obsahující 2,0 ml nebo méně roztoku referenčního přípravku, uhynou a všechny, kterým byly vstříknuty směsi obsahující více roztoku referenčního přípravku, přežijí.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Immunoserum gangraenicum mixtum

Směsné imunní sérum proti plynaté sněti

Synonymum. Immunoglobulinum antigangraenosum

Připravuje se smícháním imunních sér proti toxinu *Cl. novyi*, *Cl. perfringens* a *Cl. septicum* ve vhodných poměrech.

Zkoušky totožnosti

Specificky neutralizuje alfa-toxiny vytvořené mikroorganismy *Clostridium novyi* (dřívější název: *Clostridium oedematiens*), *Clostridium perfringens* a *Clostridium septicum* a činí je neškodnými pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum.*

Stanovení účinnosti

Nejméně 1000 m.j. antitoxinu novyi v mililitru, nejméně 1000 m.j. antitoxinu perfringens v mililitru, nejméně 500 m.j. antitoxinu septicum v mililitru.

Účinnost jednotlivých složek se stanoví biologickou zkouškou, která je předepsána v článcích Immunoserum gangraenicum (*Clostridium novyi*), Immunoserum gangraenicum (*Clostridium perfringens*) a Immunoserum gangraenicum (*Clostridium septicum*).

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum.*

Immunoserum tetanicum ad usum humanum

Tetanické imunní sérum pro humánní použití

Synonymum. Globulinum antitetanicum

Je to přípravek obsahující antitoxické globuliny, které mají schopnost specificky neutralizovat toxin vytvářený mikroorganismem *Clostridium tetani.*

Výroba

Získává se frakcionací ze séra koní nebo jiných savců imunizovaných proti tetanickému toxinu.

Zkouška totožnosti

Specificky neutralizuje toxin vytvářený *Cl. tetani* a činí jej neškodným pro vnímavé živočichy.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum humanum.*

Stanovení účinnosti

Profylaktický přípravek obsahuje nejméně 1000 m.j. antitoxinu v mililitru. Terapeutický přípravek obsahuje nejméně 3000 m.j. antitoxinu v mililitru.

Účinnost se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně morčat nebo myší před paralytickým účinkem určité dávky tetanického toxinu s dávkou standardního přípravku tetanického antitoxinu potřebnou k dosažení stejné ochrany. Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu. Pro ni je počet zvířat a postup stejný s paralytickou metodou, ale místo příznaků paralýzy se odečítá úhyn zvířat a místo dávky Lp/10 se používá dávka L+/10. Pro toto porovnání je zapotřebí referenční přípravek tetanického antitoxinu kalibrovaný v mezinárodních jednotkách a vhodný přípravek tetanického toxinu, který se použije jako zkušební toxin. Účinnost zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného tetanického antitoxinu se stanoví ve vztahu k účinnosti zkušebního toxinu stejnou metodou.

Mezinárodní jednotka antitoxinu je specifická neutralizační účinnost proti tetanickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství suchého imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Výběr zvířat. Jestliže se použijí myši, není rozdíl hmotnosti mezi nejlehčí a nejtěžší větší než 5 g.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu asi devítidenní kultury *Cl. tetani* v tekuté živné půdě. K filtrátu se přidají 1 až 2 objemové díly *glycerolu R* a směs se uchovává těsně pod 0 °C. Alternativně se k filtrátu přidá *síran amonný R*, oddělí se sraženina, která obsahuje toxin, vysuší se ve vakuu nad *oxidem fosforečným R*, upráškuje se a uchovává se suchá buď v zatavených ampulkách, nebo ve vakuu nad *oxidem fosforečným R.*

Stanovení zkušební dávky toxinu (Lp/10 dávka). Připraví se roztok porovnávacího přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,5 m.j. antitoxinu.

Jestliže je toxin uchováván jako suchý, rozpustí se ve vhodném rozpouštědle.

Připraví se směsi roztoků porovnávacího přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku porovnávacího přípravku, jeden řady z odstupňovaných objemů zkušebního toxinu a vhodnou tekutinu doplňující směsi na 5,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Z každé směsi se subkutánně vstříkne šesti myším po 0,5 ml a myši se pozorují 96 h. Myši s příznaky paralýzy se mohou utratit.

Zkušební dávka toxinu je ono množství, jež je obsaženo v 0,5 ml směsi s nejnižším obsahem toxinu, která přes jeho částečnou neutralizaci je ještě schopna způsobit paralýzu všech šesti myší v průběhu pozorovací doby.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. Připraví se roztok porovnávacího přípravku ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 0,5 m.j. antitoxinu.

Připraví se roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině tak, aby v mililitru bylo obsaženo 5 zkušebních dávek.

Připraví se směsi roztoků zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, jeden z řady odstupňovaných objemů zkoušeného přípravku a vhodnou tekutinu doplňující směs na 5,0 ml.

Podobně se připraví směsi roztoků zkušebního toxinu a porovnávacího přípravku tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu, dále jeden z řady odstupňovaných objemů roztoku porovnávacího přípravku s tím, že uprostřed řady je objem (2,0 ml), který obsahuje 1 m.j. antitoxinu, a vhodnou tekutinu doplňující směsi na 5,0 ml. Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě, chráněny před světlem. Z každé směsi se subkutánně vstříkne šesti myším po 0,5 ml a myši se pozorují 96 h. Myši s příznaky paralýzy se mohou utratit.

Směs obsahující největší objem antitoxinu, který nestačí ochránit myši před paralýzou, obsahuje 1 m.j. Toto množství se použije k výpočtu účinnosti zkoušeného přípravku v mezinárodních jednotkách v mililitru.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechny myši, kterým byla vstříknuta směs s obsahem více než 2,0 ml roztoku porovnávacího přípravku, nemají příznaky paralýzy a všechny myši, kterým byla vstříknuta směs s obsahem 2,0 ml nebo méně roztoku porovnávacího přípravku, mají příznaky paralýzy.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum humanum*.

Immunoserum tetanicum ad usum veterinarium

Imunní sérum proti tetanu pro veterinární použití

Je to přípravek obsahující globuliny schopné specificky neutralizovat neurotoxin, který vytváří *Clostridium tetani*. Je to sérum nebo přípravek ze séra zvířat imunizovaných proti tetanickému toxinu.

Zkouška totožnosti

Specificky neutralizuje neurotoxin vytvářený *Cl. tetani* a činí jej neškodným pro vnímavá zvířata.

Zkoušky na čistotu

Vyhovuje zkouškám předepsaným v článku *Immunosera ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Účinnost nativního séra je nejméně 300 m.j./ml u koňského séra a nejméně 150 m.j./ml u séra skotu.

Účinnost koncentrovaného séra je nejméně 1000 m.j./ml u koňského séra a nejméně 500 m.j./ml u séra skotu.

Mezinárodní jednotka je specifická neutralizační účinnost proti tetanickému toxinu obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší (nebo morčat) před toxickým účinkem neměnné zkušební dávky tetanického toxinu s dávkou referenčního přípravku imunního séra proti tetanickému toxinu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, která je nezbytná k dosažení stejné ochrany. Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu. Pro ni je počet zvířat a postup stejný s paralytickou metodou, ale mezním bodem je úhyn zvířete místo začátku paralýzy a místo dávky $L_p/10$ a 50% paralytické dávky se používá dávka L+/10 a LD_{50}. Pro toto porovnání se jako zkušební toxin používá vhodný přípravek tetanického toxinu. Dávka zkušebního toxinu se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku. Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví ve vztahu k referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu 8denní až 10denní kultury *Cl. tetani* v tekuté živné půdě. K jednomu objemovému dílu filtrátu se přidá 1 až 2 objemové díly glycerolu. Roztok zkušebního toxinu se uchovává těsně pod 0 °C. Toxin se může také vhodnou metodou vysušit.

Zkušební toxin se vybere podle dávky Lp/10 a 50% paralytické dávky pro myši. Vhodný toxin obsahuje nejméně tisícinásobek 50% paralytické dávky v jedné dávce Lp/10.

Dávka Lp/10 (Limes paralyticum). Je to nejmenší množství toxinu, které po smíchání s 0,1 m.j. antitoxinu způsobí do 4 dnů u myší (nebo morčat) po subkutánním podání tetanickou paralýzu.

50% paralytická dávka. Je to množství toxinu, které způsobí do 4 dnů u myší (nebo morčat) po subkutánním podání tetanickou paralýzu poloviny pokusných zvířat.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Referenční přípravek se rozpustí nebo zředí ve vhodné tekutině tak, aby 1 ml obsahoval 0,5 m.j. Zkušební toxin se odměří nebo odváží a rozpustí se nebo zředí ve vhodné tekutině. Dále se připraví směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala v jedné injekční dávce 0,1 m.j. antitoxinu a jeden z odstupňovaných objemů zkušebního toxinu. Rozdíly mezi sousedními objemy jsou nejvýše 20 % a řada ředění přesahuje předpokládaný mezní bod. Všechny směsi se zředí vhodnou tekutinou na stejný konečný objem (4,0 ml, pokud se používají ke zkoušce morčata, nebo na 0,4 ml až 0,6 ml, pokud se používají myši). Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata, z nichž se každému subkutánně vstříkne výše uvedená dávka směsi. Zvířata se pozorují 96 h a denně se u každé skupiny zaznamenává stupeň rozvoje tetanických příznaků. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a z průměru hodnot stanovených v jednotlivých zkouškách se vypočítá zkušební dávka. Zkušební dávka toxinu je množství toxinu obsažené v té směsi, která způsobila tetanickou paralýzu poloviny pokusných zvířat, jimž se tato směs podala.

Jakmile se stanoví zkušební dávka toxinu, může se připravit koncentrovaný roztok zkušebního toxinu ve směsi obsahující 1 objemový díl roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a 1 nebo 2 objemové díly *glycerolu R*. Tento koncentrovaný roztok se může skladovat zmražený a ředit podle potřeby. Specifická účinnost tohoto roztoku by se měla často přezkoušet.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku.

Předběžná zkouška: Odměří se nebo odváží nějaké množství zkušebního toxinu a rozpustí se nebo zředí ve vhodné tekutině tak, aby roztok v 1 ml obsahoval 5 zkušebních dávek (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby v každé směsi objem zvolený k podání obsahoval zkušební dávku toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku. Všechny směsi se doplní vhodnou tekutinou na shodný objem.

Směsi se 60 min uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata, jimž se každému subkutánně vstříkne zvolený objem. Zvířata se pozorují 96 h a denně se u každé skupiny zaznamenává stupeň rozvoje tetanických příznaků. Podle výsledků se vybere nejvhodnější směs pro konečnou zkoušku.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného přípravku tak, aby v každé směsi objem zvolený k podání obsahoval zkušební dávku toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného přípravku (v řadě se stoupající objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje předpokládaný mezní bod stanovený v předběžné zkoušce). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi se stejným množstvím zkušebního toxinu a stupňujícími se objemy referenčního přípravku; uprostřed řady bude 0,1 m.j. v objemu zvoleném k podání. Všechny směsi se doplní vhodnou tekutinou na stejný objem a 60 min se uchovávají při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata, z nichž se každému subkutánně vstříkne zvolená dávka. Zvířata se pozorují 96 h a denně se u každé skupiny zaznamenává stupeň rozvoje tetanických příznaků. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m.j. v podaném objemu, je ta směs, která způsobí tetanickou paralýzu u stejného nebo téměř stejného množství zvířat jako referenční směs obsahující 0,1 m.j. v podaném objemu.

Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) jsou stanoveny takto:
- 85 % a 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5 % a 109 %, použila-li se tři zvířata na dávku,
- 93 % a 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Immunosera ad usum veterinarium*.

V označení obalu se uvede, zda výrobek obsahuje nativní nebo koncentrované sérum.

Insulini biphasici iniectio

Injekce s dvousložkovým insulinem

Injekce s dvousložkovým insulinem vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia a následujícím požadavkům a zkouškám.

Je to sterilní suspenze krystalů hovězího insulinu a prasečího insulinu.

Vlastnosti

Bílá suspenze. Při mikroskopickém pozorování jsou patrny rombické krystaly s největším rozměrem měřeným od rohu k rohu větším než 10 µm, ale zřídka přesahujícím 40 µm.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční časy píků dvou insulinů na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají retenčním časům hlavních píků na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,6 až 7,2.

Insulin v supernatantu. 22,0 % až 28,0 % insulinu v roztoku. Stanoví se postupem uvedeným v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Celkový zinek. 26,0 μg až 37,5 μg na 100 m.j. insulinu. Stanoví se postupem uvedeným v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Insulini isophani biphasici iniectio

Injekce s dvousložkovým isulinem a s isofaninsulinem

Injekce s dvousložkovým insulinem a s isofaninsulinem vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia, kromě zkoušky Insulin v supernatantu, a následujícím požadavkům a zkouškám.

Je to sterilní pufrovaná suspenze komplexu prasečího nebo lidského insulinu s protaminiumsulfatem nebo jiným vhodným protaminem v roztoku insulinu téhož živočišného druhu.

Výroba

Injekce s dvousložkovým insulinem a isofaninsulinem se vyrábí postupy uvedenými v článku Praeparata insulini iniectabilia.

Při výrobě se smíchá v definovaném poměru Injekce s isofaninsulinem a Injekce s rozpustným insulinem.

Množství protaminu v komplexu odpovídá isofanickému poměru a je 0,3 mg až 0,6 mg protaminiumsulfatu na každých 100 m.j. insulinu.

Vlastnosti

Bílá suspenze, která se stáním rozděluje na bílý sediment a bezbarvou nebo téměř bezbarvou tekutinu; mírným protřepáním se sediment snadno resuspenduje. Při mikroskopickém pozorování jsou patrny tyčinkovité krystaly, jejichž velikost je většinou větší než 1 μm, ale zřídka přesahuje 60 μm; neobsahuje velké shluky.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas píku insulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Celkový zinek. Nejvýše 40,0 μg na 100 m.j. insulinu. Stanoví se postupem uvedeným v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Označování

V označení na obalu se k požadavkům na označování uvedeným v článku *Praeparata insulini injectabilia* doplní:

- poměr použitého množství injekcí s rozpustným insulinem k použitému množství injekcí s isofaninsulinem při výrobě.

Insulini isophani iniectio

Injekce s isofaninsulinem

Injekce s isofaninsulinem vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia a následujícím požadavkům a zkouškám.

Je to sterilní suspenze prasečího, hovězího nebo lidského insulinu v komplexu s protaminiumsulfatem nebo jiným vhodným protaminem.

Výroba

Injekce s isofaninsulinem se vyrábí postupy uvedenými v článku Praeparata insulini iniectabilia.

Množství protaminu v komplexu odpovídá isofanickému poměru a je 0,3 mg až 0,6 mg protaminiumsulfatu na každých 100 m.j. insulinu.

Vlastnosti

Bílá suspenze, která se stáním rozděluje na bílý sediment a bezbarvou nebo téměř bezbarvou tekutinu; mírným protřepáním se sediment snadno resuspenduje. Při mikroskopickém pozorování jsou patrny tyčinkovité krystaly, jejichž velikost je většinou větší než 1 μm, ale zřídka přesahuje 60 μm; neobsahuje velké shluky.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas píku insulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Celkový zinek. Nejvýše 40,0 μg na 100 m.j. insulinu. Stanoví se postupem uvedeným v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Insulini solubilis iniectio

Injekce s rozpustným insulinem

Injekce s rozpustným insulinem vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia a následujícím požadavkům.

Je to sterilní neutrální roztok hovězího, prasečího nebo lidského insulinu.

Vlastnosti

Bezbarvá tekutina prostá zákalu a mechanických částic; během uchovávání může vzniknout náznak velmi jemného sedimentu.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas píku insulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Celkový zinek. Nejvýše 40,0 μg na 100 m.j. insulinu. Stanoví se postupem uvedeným v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Použije se zkoušený roztok připravený takto:

Zkoušený roztok. Za mírného protřepání se zředí množství zkoušeného přípravku odpovídající 200 m.j. *vodou R* na 25,0 ml. V případě potřeby se zředí na vhodnou koncentraci, např. 0,4 μg až 1,6 μg zinku v mililitru.

Insulini zinci amorphi iniectio in suspensione

Injekce amorfního insulinu se zinkem v suspenzi

Synonymum. Injectio insulini amorphi cum zinco

Injekce amorfního insulinu se zinkem v suspenzi vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia a následujícím požadavkům a zkouškám.

Je to sterilní neutrální suspenze prasečího nebo hovězího insulinu v komplexu s vhodnou solí zinku; insulin v této formě je nerozpustný ve vodě.

Vlastnosti

Bílá suspenze, která se stáním rozděluje na bílý sediment a bezbarvou nebo téměř bezbarvou tekutinu; jemným protřepáním se sediment snadno resuspenduje. Při mikroskopickém pozorování jsou patrny částice různého tvaru, jejichž velikost zřídka přesahuje 2 μm.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas píku insulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Celkový zinek. Nejvýše 0,095 g/l pro přípravky obsahující 40 m.j. insulinu v mililitru, nejvýše 0,140 g/l pro přípravky obsahující 80 m.j. insulinu v mililitru a nejvýše 0,20 g/l pro přípravky obsahující 100 m.j. insulinu v mililitru. Postup stanovení je uveden v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Zinek v roztoku. Nejvýše 70 % celkového zinku pro přípravky obsahující 40 m.j. insulinu v mililitru, nejvýše 55 % celkového zinku pro přípravky obsahující 80 m.j. insulinu v mililitru a nejvýše 50 % celkového obsahu zinku pro přípravky obsahující 100 m.j. insulinu v mililitru. Postup stanovení je uveden v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Insulini zinci cristallisati iniectio in suspensione

Injekce krystalického insulinu se zinkem v suspenzi

Synonymum. Injectio insulini crystallisati cum zinco

Injekce krystalického insulinu se zinkem v suspenzi vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia a násedujícím požadavkům a zkouškám.

Je to sterilní neutrální suspenze prasečího a hovězího insulinu nebo lidského insulinu v komplexu s vhodnou solí zinku; krystaly této formy insulinu jsou nerozpustné ve vodě.

Vlastnosti

Bílá suspenze, která se stáním rozděluje na bílý sediment a bezbarvou nebo téměř bezbarvou tekutinu; jemným protřepáním se sediment snadno resuspenduje. Při mikroskopickém pozorování jsou patrny rombické krystaly, jejichž velikost měřená od rohu k rohu je většinou větší než 10 µm, ale zřídka přesahuje 40 µm.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. Retenční čas píku insulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Insulin neextrahovatelný tlumivým roztokem acetonovým. Nejméně 90 % celkového obsahu insulinu. Odstřeďuje se objem zkoušeného přípravku odpovídající 200 m.j. insulinu a supernatantní tekutina se odstraní. Zbytek se suspenduje v 1,65 ml *vody R,* přidá se 3,3 ml *tlumivého roztoku acetonového*, nechá se 3 min stát a pak se opět odstřeďuje. Supernatantní tekutina se opět odstraní

a tento postup se ještě jednou opakuje. Zbytek se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 2,0 ml. Vhodnou metodou se stanoví obsah insulinu ve zbytku (R) a celkový obsahu insulinu (T) stejného objemu suspenze. Vypočítá se obsah insulinu neextrahovaného *tlumivým roztokem acetonovým* v procentech podle vzorce:

$$\frac{100R}{T}.$$

Celkový zinek. Nejvýše 0,095 g/l pro přípravky obsahující 40 m.j. insulinu v mililitru, nejvýše 0,140 g/l pro přípravky obsahující 80 m.j. insulinu v mililitru a nejvýše 0,20 g/l pro přípravky obsahující 100 m.j. insulinu v mililitru. Postup stanovení je uveden v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Zinek v roztoku. Nejvýše 70 % celkového zinku pro přípravky obsahující 40 m.j insulinu v mililitru, nejvýše 55 % celkového zinku pro přípravky obsahující 80 m.j. insulinu v mililitru a nejvýše 50 % celkového obsahu zinku pro přípravky obsahující 100 m.j. insulinu v mililitru. Postup stanovení je uveden v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Insulini zinci iniectio in suspensione

Injekce insulinu se zinkem v suspenzi

Injekce insulinu se zinkem v suspenzi vyhovuje požadavkům článku Praeparata insulini iniectabilia a následujícím požadavkům a zkouškám.

Je to sterilní neutrální suspenze insulinu (hovězího, prasečího nebo hovězího a prasečího nebo lidského) v komplexu s vhodnou solí zinku; insulin v této formě je nerozpustný ve vodě.

Výroba

Injekce se suspenzí insulinu a zinku se vyrábí postupy uvedenými v článku Praeparata insulini iniectabilia.

Při výrobě se smíchá v poměru 7 : 3 Injekce krystalického insulinu se zinkem v suspenzi a Injekce amorfního insulinu se zinkem v suspenzi.

Vlastnosti

Bílá suspenze, která se stáním rozděluje na bílý sediment a bezbarvou nebo téměř bezbarvou tekutinu; jemným protřepáním se sediment snadno resuspenduje. Při mikroskopickém pozorování jsou patrny rombické krystaly s největším rozměrem měřeným od rohu k rohu větším než 10 µm, ale zřídka přesahujícím 40 µm; značnou část částic lze pozorovat při velkém zvětšení jako částice nepravidelného tvaru o velikosti nepřevyšující 2 μm.

Zkoušky totožnosti

Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Stanovení obsahu. U přípravků vyrobených z jednoho druhu insulinu (hovězího, prasečího nebo hovězího a prasečího nebo lidského) retenční čas píku insulinu na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku.

U přípravků vyrobených ze směsi prasečího a hovězího insulinu retenční časy dvou píků na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají hlavním píkům na chromatogramech odpovídajících porovnávacích roztoků.

Zkoušky na čistotu

Insulin neextrahovaný tlumivým roztokem acetonovým. 63 % až 77 % celkového obsahu insulinu. Odstřeďuje se objem zkoušeného přípravku odpovídající 200 m.j. insulinu a supernatantní tekutina se odstraní. Zbytek se suspenduje v 1,65 ml *vody R,* přidá se 3,3 ml *tlumivého roztoku acetonového*, nechá se 3 min stát a pak se opět odstřeďuje, supernatantní tekutina se opět odstraní a tento postup se ještě jednou opakuje. Zbytek se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 0,1 mol/l RS* a zředí se jí na 2,0 ml. Stanoví se obsah insulinu ve zbytku *(R)* a stanoví se celkový obsah insulinu *(T)* stejného objemu suspenze vhodnou metodou. Vypočítá se obsah insulinu neextrahovaného tlumivým roztokem acetonovým v procentech podle vzorce:

$$\frac{100R}{T}.$$

Celkový zinek. Nejvýše 0,095 g/l pro přípravky obsahující 40 m.j. insulinu v mililitru, nejvýše 0,140 g/l pro přípravky obsahující 80 m.j. insulinu v mililitru a nejvýše 0,20 g/l pro přípravky obsahující 100 m.j. insulinu v mililitru. Postup stanovení je uveden v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

Zinek v roztoku. Nejvýše 70 % celkového zinku pro přípravky obahující 40 m.j insulinu v mililitru, nejvýše 55 % celkového zinku pro přípravky obsahující 80 m.j. insulinu v mililitru a nejvýše 50 % celkového obsahu zinku pro přípravky obsahující 100 m.j. insulinu v mililitru. Postup stanovení je uveden v článku *Praeparata insulini iniectabilia*.

† Ipecacuanhae pulvis normatus

Práškovaný hlavěnkový kořen titrovaný

Je to práškovaný (180) kořen hlavěnky, jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo drogy s nižším obsahem alkaloidů tak, aby celkový obsah alkaloidů, počítáno jako emetin ($C_{29}H_{40}N_2O_4$; M_r 480,7), činil 1,9 % až 2,1 %, vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga nevýrazného pachu.
Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

A. Světle šedý až žlutohnědý prášek. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS*. Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: parenchymatické buňky; rafidy šťavelanu vápenatého až 80 μm dlouhé, buď ve svazcích, nebo rozptýlené ve formě písku; úlomky cévic a cév zpravidla 10 μm až 20 μm v průměru, s ohraničenými dvůrky; delší cévy a sklereidy z oddenku.

Pozoruje se v roztoku *glycerolu R* 50% (*V/V*). V parenchymatických buňkách jsou patrna škrobová zrna buď jednotlivá, nebo ve složení po dvou až osmi, u *C. ipecacuanha* až 15 μm v průměru, u *C. acuminata* až 22 μm v průměru. Při hodnocení v *glycerolu 85% R* mohou být patrné krystaly laktosy.

B. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 0,1 g se smíchá ve zkumavce s 0,05 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *etheru R* a směs se důkladně promíchá skleněnou tyčinkou. Po 30 min stání se zfiltruje.
Porovnávací roztok. 2,5 mg *emetiniumdichloridu CRL* a 30 mg *cefaëliniumdichloridu R* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl obou roztoků. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *methanolu R*, *ethylacetatu R* a *toluenu R* (2 + 15 + + 18 + 65) po dráze 10 cm. Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se roztokem *jodu R* (5 g/l) v *lihu 96% R* a suší se 10 min při 60 °C. Pozoruje se v denním světle. Na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku je v dolní části patrna žlutá skvrna (emetin) a pod ní světle hnědá skvrna (cefaëlin). Vrstva se pozoruje v ultrafialovém světle při 365 nm. Skvrna odpovídající emetinu je intenzivně žlutá, skvrna odpovídající cefaëlinu světle modrá. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrné další, méně výrazné skvrny.

C. acuminata hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku.

C. ipecacuanha liší se od výše uvedeného druhu tím, že skvrna odpovídající cefaëlinu na chromatogramu zkoušeného roztoku je výrazně menší než odpovídající skvrna na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 5,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 3,0 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %. 1,000 g drogy se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

7,50 g se odváží do suché baňky, přidá se 100 ml *etheru R* a protřepává se 5 min. Pak se přidá 5 ml *amoniaku zředěného RS1* a protřepává se 1 h. Přidá se 5 ml *vody R* a znovu se intenzivně protřepe. Etherová vrstva se zfiltruje chomáčkem vaty. Zbytek v baňce se promyje dvakrát 25 ml *etheru R* a každý etherový podíl se zfiltruje chomáčkem vaty, použitým k první filtraci. Spojené etherové podíly se oddestilují do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml *lihu R* 90% (*V/V*), odpaří se do sucha a odparek se suší 5 min při 100 °C. Zbytek po odpaření se na vodní lázni rozpustí v 5 ml předem neutralizovaného *lihu R* 90% (*V/V*). Přidá se 15,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS*, 0,5 ml *červeně methylové směsného indikátoru R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS*.

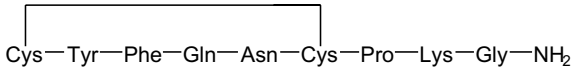
1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 24,03 mg celkových alkaloidů, počítáno jako emetin ($C_{29}H_{40}N_2O_4$; M_r 480,7).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

† Lypressini solutio iniectabilis

Injekce s lypresinem



Je to sterilní roztok cyklického nonapeptidu lypresinu ve vodě na injekci. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok a protimikrobní konzervační látku a může být izotonizován s krví přídavkem chloridu sodného. Rozplňuje se asepticky do sterilních skleněných obalů třídy I (*3.2.1*), které se potom zataví. Vyhovuje článku *Parenteralia*.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Zkoušky totožnosti

A. Intravenózní podání vyvolává vzestup arteriálního krevního tlaku u anestezovaného laboratorního potkana, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti.

B. Subkutánní podání zpomalí vylučování u savců současně perorálně podané vody.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 3,7 až 4,3.

Aminokyseliny. Stanoví se analyzátorem aminokyselin za použití *DL-norleucinu R* jako vnitřního standardu. Přístroj se nastaví směsí obsahující ekvimolární množství amoniaku, glycinu a L-forem následujících aminokyselin:

lysin	serin	methionin
histidin	kyselina glutamová	isoleucin
arginin	prolin	leucin
kyselina asparagová	alanin	tyrosin
threonin	valin	fenylalanin

a polovinu ekvimolárního množství L-cystinu.

Roztok vnitřního standardu. 0,25 g *DL-norleucinu R* se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* a zředí se touto směsí na 100,0 ml.

Zkoušený roztok. Připraví se kolona o průměru asi 10 mm za použití 5 ml *katexu slabě kyselého R*. Katex se promyje roztokem *kyseliny octové ledové R* (500 g/l) a pak se promývá *vodou R*, až eluát reaguje neutrálně na červeň methylovou. Sloupcem se nechá protéct množství zkoušeného přípravku odpovídající 1000 m.j. Pak se sloupcem nechá protéct šestkrát po 5 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* (1 g/l) k odstranění nebílkovinných složek. Eluce lypresinu se provede roztokem *kyseliny octové ledové R* (500 g/l) desetkrát po 5 ml. Tyto druhé eluáty se spojí a odpaří do sucha za sníženého tlaku při 30 °C, ke zbytku se přidá přesně odměřený objem roztoku vnitřního standardu, který obsahuje množství *DL-norleucinu R* odpovídající asi předpokládanému počtu molů lypresinu. Roztok se přenese do pečlivě vymyté zkumavky z tvrzeného skla délky 100 mm a vnitřního průměru 6 mm pomocí čtyřikrát 0,3 ml směsi stejných objemů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R*. Zkumavka se vloží do mrazicí směsi při -5 °C, vytvoří se podtlak nepřevyšující 133 Pa a zkumavka se zataví.

Poté se 16 h zahřívá na 110 °C až 115 °C. Zkumavka se po ochlazení otevře, její obsah se převede do 10 ml baňky pomocí pěti dávek *vody R* po 0,2 ml. Odpaří se do sucha nad *hydroxidem draselným R* za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí ve vhodném tlumivém roztoku (pH 2,2) a zředí se jím na vhodný objem.

Do analyzátoru aminokyselin se přesně odměří objem zkoušeného roztoku tak, aby píky aminokyselin přítomných v největším množství zaujímaly většinu dosažitelné výšky záznamu. Obsahy jednotlivých aminokyselin se vyjádří v molech. Vypočítá se relativní zastoupení aminokyselin za předpokladu, že jedna šestina součtu počtu molů kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, prolinu, glycinu, fenylalaninu a lysinu se rovná 1. Hodnoty pro jednotlivé aminokyseliny jsou v těchto rozmezích: kyselina asparagová 0,95 až 1,05, kyselina glutamová 0,95 až 1,05, prolin 0,95 až 1,05, glycin 0,95 až 1,05, lysin 0,95 až 1,05, fenylalanin 0,95 až 1,05, tyrosin 0,7 až 1,05, polovina cystinu 1,4 až 2,1. Arginin, isoleucin a leucin nejsou přítomny, ostatní aminokyseliny jsou jen ve stopách.

Obsah peptidu. Množství aminokyselin stanovených, jak je předepsáno ve zkoušce Aminokyseliny, odpovídá obsahu (3,7 ± 0,4) μg lypressinu/m.j. stanovené vasopresorické účinnosti. Zkoušku lze hodnotit, jestliže počet molů norleucinu přepočtený na objem použitého zkoušeného roztoku je v rozmezí ±5 % množství použitého pro hydrolýzu.

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušeného vzorku se stanoví ze zvýšení krevního tlaku laboratorního potkana porovnáním s účinkem mezinárodního standardu lysin-vasopresinu nebo s referenčního přípravku lysin-vasopresinu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je vasopresorická účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který obsahuje syntetický lysin-vasopressin, albumin a kyselinu citronovou. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Do ocasní žíly samce bílého laboratorního potkana o hmotnosti asi 300 g se pomalu vstříkne roztok vhodného α-adrenergního blokátoru, např. 10 ml/kg tělesné hmotnosti roztoku připraveného rozpuštěním 5 mg *fenoxybenzamoniumchloridu R* v 0,1 ml *lihu 96% R*, přidáním 0,05 ml *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředěním roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) na 5 ml. Za 18 h se provede anestezie zvířete anestetikem vhodným pro udržení stálého krevního tlaku. Za 45 min až 60 min se anestezovaný potkan upevní k operačnímu stolku připoutáním zadních končetin v poloze na zádech. Zavede se skleněná nebo polyethylenová kanyla o zevním průměru 2,5 mm do průdušnice a vypreparuje se arteria carotis. V místech tříselného vazu se vypreparuje vena femoralis. K jedné straně se odkloní povrchová stydká žíla a nastříhne se femorální žíla směrem k tříselnému vazu. Z hloubky přicházející přívodní větev femorální žíly se podváže, aby se zabránilo krvácení při zavádění kanyly. Zavede se krátká polyethylenová kanyla o zevním průměru 1 mm, upevní se dvěma podvázáními a připojí se pomocí krátké ohebné hadičky na byretu s obsahem 1 ml s připojenou skleněnou nálevkou s ostrým zakončením. Byreta je naplněna roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) o teplotě asi 37 °C. Preparované místo a kanyla se zakryje navlhčenou chirurgickou rouškou, která se připevní. Vstříkne se heparin rozpuštěný v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) v dávce 200 m.j./100 g hmotnosti pokusného zvířete. Do arteria carotis se zavede kanyla o zevním průměru 1 mm a naplní se pomocí hadiček roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l), do něhož byl přidán heparin, připojí se na vhodný přístroj měřící tlak, jako je např. rtuťový manometr o vnitřním průměru 2 mm až 3 mm. Centrální a periferní nervový systém, včetně vagů a souvisejících sympatických nervů, zůstávají bez porušení. Umělé dýchání není zapotřebí. Všechny roztoky se vstříknou do žilní kanyly pomocí 1ml injekční stříkačky dělené po 0,01 ml. Po každém po-

dání se vstříkne 0,2 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) z byrety. Dává se pozor, aby nebyl vstříknut vzduch.

Referenční přípravek a zkoušený přípravek se naředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby vstřikovaný objem byl v rozmezí 0,1 ml až 0,5 ml. Zvolí se dvě dávky referenčního přípravku tak, aby zvýšení krevního tlaku odpovídalo asi 4 kPa pro nižší dávku a asi 6,67 kPa pro vyšší, ale ne maximální dávku. Poměr nižší k vyšší dávce je určen vzestupem krevního tlaku a je obvykle v poměru 3 : 5. Pro počáteční přiblížení se mohou zkusit dávky 3 milijednotky a 5 milijednotek. Během zkoušky se dvě dávky zkoušeného přípravku zvolí tak, aby jejich účinek odpovídal zvoleným dávkám referenčního přípravku a poměr mezi těmito dávkami byl stejný jako u referenčního přípravku. Dávky se vstřikují v intervalech 10 min až 15 min. Dvě dávky zkoušeného přípravku tvoří s dvěma dávkami referenčního přípravku jednu skupinu o čtyřech dávkách. Pořadí vstřikovaných dávek se při zkoušce náhodně střídá tak, aby vzniklo čtyři až pět skupin (šestnáct až dvacet dávek celkem). Zaznamená se nejvyšší zvýšení krevního tlaku po každé dávce. Výsledky zkoušky se vypočítají obvyklými statistickými metodami.

Stanovená hodnota účinnosti není nižší než 90 % a vyšší než 111 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je v rozmezí 80 % až 120 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Při teplotě 2 °C až 15 °C.
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v mezinárodních jednotkách v mililitru,
- název a množství přidaných látek.

Solutiones ad haemocolaturam

Roztoky pro hemofiltraci

Jsou to roztoky určené k parenterálnímu podání. Obsahují ionty v přibližně stejné koncentraci jako plazma. Mohou obsahovat také glukosu.

Vyhovují požadavkům uvedeným v tomto článku.

Roztoky pro hemofiltraci jsou dodávány:
- v pevných nebo polopevných plastových obalech,
- v pružných plastových obalech s vnějším zabezpečeným obalem,
- ve skleněných obalech.

Obaly a uzávěry vyhovují požadavkům pro obaly určené pro přípravky k parenterálnímu použití (*3.2*).

Používají se roztoky různého složení. Koncentrace jednotlivých látek v litru roztoku jsou obvykle v následujících rozmezích:

Tab. 1.

	Vyjádřeno v milimolech	Vyjádřeno v miliekvivalentech
sodík	125 - 150	125 - 150
draslík	0 - 4,5	0 - 4,5
vápník	1,0 - 2,5	2,0 - 5,0
hořčík	0,25 - 1,5	0,50 - 3,0
octan nebo mléčnan	30 - 60	30 - 60
chloridy	90 - 120	90 - 120
glukosa	0 - 25	

K roztokům se nepřidávají antioxidancia, jako disiřičitan.

Zkoušky totožnosti

Podle složení se provádějí následující zkoušky (*2.3.1*):
- draslík; zkouška (b),
- vápník; zkouška (a),
- sodík; zkouška (b),
- chloridy; zkouška (a),
- octany:
  - neobsahuje-li přípravek glukosu, provede se zkouška (b),
  - obsahuje-li přípravek glukosu, provede se následující zkouška: do zkumavky se zátkou, v níž je upevněná zahnutá trubička, se převede 5 ml zkoušeného přípravku a přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R.* Zahřívá se a zachytí se několik mililitrů destilátu, ve kterém se provede zkouška (b) na octany,
- mléčnany;
- hořčík; k 0,1 ml *žluti titanové RS* se přidá 10 ml *vody R*, 2 ml zkoušeného přípravku a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, vznikne růžové zbarvení,
- glukosa; k 5 ml zkoušeného přípravku se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,05 ml *síranu měďnatého RS;* roztok je modrý a čirý. Zahřeje se k varu; vznikne objemná červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Zkoušený přípravek je čirý (*2.2.1*). Jestliže neobsahuje glukosu, je bezbarvý (*2.2.2, Metoda I*). Jestliže obsahuje glukosu, není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 7,5; měří se zkoušený přípravek. Jestliže obsahuje glukosu, hodnota pH je 4,5 až 6,5.

Hydroxymethylfurfural. K objemovému množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu 25 mg glukosy se přidá 5,0 ml roztoku *p-toluidinu R* (100 g/l) v *2-propanolu R* obsahujícím 10 % (*V/V*) *kyseliny octové ledové R* a 1,0 ml roztoku *kyseliny barbiturové R* (5 g/l). Směs se nechá 2 min až 3 min stát; absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) měřená při 550 nm není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem obsahujícího 10 μg *hydroxymethylfurfuralu R* ve stejném objemu, jako je zkoušený přípravek.

Hliník (*2.4.17*). Ke 200 ml zkoušeného přípravku, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 6,0, se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0;* roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (10 μg/l). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 9 ml *vody R*. Připraví se kontrolní roztok, kterým je směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 10 ml *vody R*.

Kontaminace částicemi. S 50 ml zkoušeného přípravku se provede zkouška na částice pod hranicí viditelnosti (*2.9.19*).

Tab. 2.

Velikost částic	větší než 5 μm	větší než 25 μm
Nejvyšší počet částic v mililitru	100	5

Využitelný objem (*2.9.17*). Vyhovuje zkoušce předepsané pro infuzní přípravky.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v mililitru.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Zkoušené přípravky, u kterých nelze provést validovanou zkoušku na bakteriální endotoxiny, vyhovují zkoušce na pyrogenní látky. Vstřikuje se 10 ml roztoku na kilogram hmotnosti králíka.

Stanovení obsahu

Sodík. 97,5 % až 102,5 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* tak, aby jeho koncentrace byla vhodná pro stanovení na použitém přístroji.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)*.

Měří se absorbance při 589,0 nm za použití sodíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Draslík. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* tak, aby koncentrace byla vhodná pro stanovení na použitém přístroji. Ke 100 ml roztoku se přidá 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (22 g/l).
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku draslíku (100 μg K/ml)*. Ke 100 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (22 g/l).

Měří se absorbance při 766,5 nm za použití draslíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Vápník. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* na koncentraci, která je vhodná pro stanovení na použitém přístroji.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku vápníku (400 μg Ca/ml)*.

Měří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Hořčík. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* na koncentraci, která je vhodná pro stanovení na použitém přístroji.

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku hořčíku (100 µg Mg/ml)*.

Měří se absorbance při 285,2 nm za použití hořčíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Celkové chloridy. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Přesně odměřený objem zkoušeného přípravku odpovídající asi 60 mg chloridového iontu se zředí *vodou R* na 50 ml. Přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R*. Po protřepání se přidají 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do červenožlutého zbarvení.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,545 mg Cl.

Octany. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. K množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu asi 0,7 mmol octanu se přidá 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1 mmol octanu.

Mléčnany. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. K množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu asi 0,7 mmol mléčnanu se přidá 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 50 ml *acetonitrilu R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1 mmol mléčnanu.

Redukující cukry (vyjádřeno jako glukosa bezvodá). 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství glukosy. Do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou se převede objemové množství zkoušeného přípravku odpovídající 25 mg glukosy a přidá se 25,0 ml *citronanu měďnatého RS* a několik zrnek pemzy. Zahřívá se 2 min pod zpětným chladičem k varu a potom se přesně 10 min vaří. Po ochlazení se přidají 3 g *jodidu draselného R* rozpuštěného ve 3 ml *vody R* a opatrně po malých dávkách se přidává 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* (25%). Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace. Provede se slepá zkouška s 25,0 ml *vody R*.

Obsah redukujících cukrů se vyjádří jako glukosa bezvodá ($C_6H_{12}O_6$) za použití tabulky 3.

Tab. 3.

Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* (ml)	Glukosa bezvodá (mg)
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3

Uchovávání

Při teplotě nad 4 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- složení přípravku vyjádřené v g/l a v mmol/l,
- vypočítaná hodnota osmolality vyjádřená v mosmol/l,
- jmenovitý objem přípravku v obalu,
- zda je přípravek prostý bakteriálních endotoxinů nebo zda je prostý pyrogenních látek,
- podmínky uchovávání.

Solutiones ad haemodialysim

Roztoky pro hemodialýzu

Jsou to roztoky obsahující ionty v přibližně stejné koncentraci jako plazma. Mohou obsahovat také glukosu.

Roztoky pro hemodialýzu se používají ve velkých objemech, proto se obvykle připravují ředěním koncentrovaných roztoků vodou vhodné jakosti, viz *Voda pro ředění roztoků pro hemodialýzu*, s použitím např. automatického dávkovacího zařízení.

Koncentrované roztoky pro hemodialýzu

Při přípravě a uchovávání koncentrovaných roztoků pro hemodialýzu se používají materiály a postupy, které zajišťují co nejmenší mikrobiální kontaminaci. V určitých případech je nutno použít roztoky sterilní.

Během ředění a použití roztoků se dodržují opatření zamezující mikrobiální kontaminaci. Zředěné roztoky se použijí ihned po přípravě.

Koncentrované roztoky pro hemodialýzu jsou dodávané:
- v pevných, polopevných nebo pružných plastových obalech,
- ve skleněných obalech.

Používají se dva typy koncentrovaných roztoků.

1. Koncentrované roztoky s octanem nebo mléčnanem

Používá se několik složení těchto roztoků. Koncentrace látek v roztocích je taková, aby po zředění na předepsaný objem jeden litr roztoku obsahoval jednotlivé látky obvykle v následujících rozmezích.

Tab. 1.

	Vyjádřeno v mmol	Vyjádřeno v mEkv
sodík	130 - 145	130 - 145
draslík	0 - 3,0	0 - 3,0
vápník	0 - 2,0	0 - 4,0
hořčík	0 - 1,2	0 - 2,4
octan nebo mléčnan	32 - 45	32 - 45
chloridy	90 - 120	90 - 120
glukosa	0 - 12,0	

Koncentrované roztoky s octanem nebo mléčnanem se ředí před použitím.

2. Koncentrované kyselé roztoky

Používá se několik složení těchto roztoků. Koncentrace látek v roztocích je taková, aby po zředění na předepsaný objem a před neutralizací hydrogenuhličitanem sodným jeden litr roztoku obsahoval jednotlivé látky obvykle v následujících rozmezích.

Tab. 2.

	Vyjádřeno v mmol	Vyjádřeno v mEkv
sodík	80 - 110	80 - 110
draslík	0 - 3,0	0 - 3,0
vápník	0 - 2,0	0 - 4,0
hořčík	0 - 1,2	0 - 2,4
kyselina octová	2,5 - 10	2,5 - 10
chloridy	90 - 120	90 - 120
glukosa	0 - 12,0	

Hydrogenuhličitan sodný se přidá těsně před použitím ve formě roztoku nebo v pevném stavu. Jeho konečná koncentrace není vyšší než 45 mmol v litru. Koncentrovaný roztok hydrogenuhličitanu sodného je dodáván ve zvláštním obalu. Koncentrované kyselé roztoky a koncentrovaný roztok hydrogenuhličitanu sodného se ředí a smíchávají ve vhodném zařízení těsně před použitím. Do zředěného roztoku je možné přidat hydrogenuhličitan sodný též v pevném stavu.

Zkoušky totožnosti

Podle složení se provádějí následující zkoušky (*2.3.1*):
- draslík; zkouška (b),
- vápník; zkouška (a),
- sodík; zkouška (b),
- chloridy; zkouška (a),
- mléčnany,
- uhličitany a hydrogenuhličitany,
- octany:
  - neobsahuje-li přípravek glukosu, provede se zkouška (b),
  - obsahuje-li přípravek glukosu, provede se následující zkouška: do zkumavky se zátkou, v níž je upevněná zahnutá trubička, se převede 5 ml zkoušeného přípravku a přidá se 1 ml *kyseliny*

chlorovodíkové R. Zahřívá se a zachytí se několik mililitrů destilátu, ve kterém se provede zkouška (b) na octany,
- hořčík: k 0,1 ml *žluti titanové RS* se přidá 10 ml *vody R*, 2 ml zkoušeného přípravku a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS;* vznikne růžové zbarvení,
- glukosa: k 5 ml zkoušeného přípravku se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,05 ml *síranu měďnatého RS;* roztok je modrý a čirý. Zahřeje se k varu; vznikne objemná červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Vzhled roztoku. Zkoušený přípravek je čirý (*2.2.1*). Jestliže neobsahuje glukosu, je bezbarvý (*2.2.2, Metoda I*). Jestliže obsahuje glukosu, není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_7$ *(2.2.2, Metoda I)*.

Hliník (*2.4.17*). Ke 20 ml zkoušeného přípravku, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 6,0, se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0;* roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (0,1 mg/l). Porovnávací roztok se připraví za použití 1 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 9 ml *vody R*. Připraví se kontrolní roztok, kterým je směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 10 ml *vody R*.

Využitelný objem (*2.9.17*). Změřený objem není menší než jmenovitý objem uvedený v označení.

Sterilita (*2.6.1*). Pokud je v označení na obalu uvedeno, že koncentrovaný roztok pro hemodialýzu je sterilní, vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 0,5 m.j. endotoxinu v mililitru zředěného roztoku.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Zkoušené přípravky, u kterých nelze provést validovanou zkoušku na bakteriální endotoxiny, vyhovují zkoušce na pyrogenní látky. Zkoušený přípravek se zředí *vodou na injekci R* na koncentraci předepsanou pro použití. Vstřikuje se 10 ml tohoto roztoku na kilogram hmotnosti králíka.

Stanovení obsahu

Stanoví se relativní hustota (2.2.5) a obsah se vypočítá v g/l a mmol/l.

Sodík. 97,5 % až 102,5 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. Přesně zvážené množství zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* tak, aby jeho koncentrace byla vhodná pro stanovení na použitém přístroji.
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)*.

Měří se absorbance při 589,0 nm za použití sodíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Draslík. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Přesně zvážené množství zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* tak, aby koncentrace byla vhodná pro stanovení na použitém přístroji. Ke 100 ml roztoku se přidá 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (22 g/l).
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku draslíku (100 μg K/ml)*. Ke 100 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (22 g/l).

Měří se absorbance při 766,5 nm za použití draslíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Vápník. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Přesně zvážené množství zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* na koncentraci, která je vhodná pro stanovení na použitém přístroji.

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku vápníku (400 μg Ca/ml)*.

Měří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Hořčík. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Přesně zvážené množství zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* na koncentraci, která je vhodná pro stanovení na použitém přístroji.

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku hořčíku (100 μg Mg/ml)*.

Měří se absorbance při 285,2 nm za použití hořčíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Celkové chloridy. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Přesně zvážené množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 60 mg chloridového iontu se zředí *vodou R* na 50 ml. Přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R*. Po protřepání se přidají 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do červenožlutého zbarvení.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,545 mg Cl.

Octany. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. K množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu asi 0,7 mmol octanu se přidá 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1 mmol octanu.

Mléčnany. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. K množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu asi 0,7 mmol mléčnanu se přidá 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 50 ml *acetonitrilu R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1 mmol mléčnanu.

Hydrogenuhličitan sodný. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Objemové množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 0,1 g hydrogenuhličitanu sodného se titruje *kyselinou chlorovodíkovou 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*).

1 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* odpovídá 8,40 mg $NaHCO_3$.

Redukující cukry (vyjádřeno jako glukosa bezvodá). 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství glukosy. Do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou se převede objemové množství zkoušeného přípravku odpovídající 25 mg glukosy a přidá se 25,0 ml *citronanu měďnatého RS* a několik zrnek pemzy. Zahřívá se 2 min pod zpětným chladičem k varu a potom se přesně 10 min vaří. Po ochlazení se přidají 3 g *jodidu draselného R* rozpuštěné ve 3 ml *vody R* a opatrně po malých dávkách se přidává 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* (25%). Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace. Provede se slepá zkouška s 25,0 ml *vody R*.

Obsah redukujících cukrů se vyjádří jako glukosa bezvodá ($C_6H_{12}O_6$) za použití tabulky 3.

Tab. 3.

Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* (ml)	Glukosa bezvodá (mg)
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3

Uchovávání

Při teplotě nad 4 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- složení přípravku vyjádřené v g/l a v mmol/l,
- jmenovitý objem přípravku v obalu,
- zda je přípravek sterilní,
- podmínky uchovávání,
- že koncentrovaný přípravek je nutno před použitím zředit,
- způsob ředění,
- že přípravek musí být přesně dávkován,
- iontové složení zředěného přípravku připraveného k použití v mmol/l,
- že nespotřebovaný přípravek je nutno odstranit,
- že se před použitím přidá hydrogenuhličitan sodný, pokud je to vhodné.

Solutiones ad haemodialysim, Aqua ad concetratas solutiones diluendas haemodialysi

Voda pro ředění koncentrovaných hemodialyzačních roztoků

Následující článek má informativní charakter a jeho ustanovení nejsou závazná.
Popsané analytické metody a navrhované limity slouží k validaci postupu pro získání vody.

Voda pro ředění koncentrovaných dialyzačních roztoků se získá destilací, reverzní osmózou, výměnou iontů nebo jinou vhodnou metodou z pitné vody. Podmínky přípravy, dopravy a uchovávání mají být takové, aby riziko chemické a mikrobiologické kontaminace bylo co nejmenší.

Když voda získaná jednou z výše popsaných metod není dostupná, je možno pro domácí dialýzu použít pitnou vodu. Protože se chemické složení pitné vody značně liší od jedné lokality ke druhé, je nutné brát v úvahu její chemické složení a obsah iontů se musí upravit tak, aby jejich koncentrace ve zředěném roztoku odpovídala zamýšlenému použití.

Je nutné též dát pozor na možnou přítomnost zbytků z ošetření vody (např. chloraminy) a na přítomnost těkavých halogenovaných uhlovodíků.

Pro dohled na kvalitu vody pro ředění koncentrovaných dialyzačních roztoků jsou určeny následující metody, jež stanoví chemické složení a případně též detekují přítomnost možných nečistot spolu s návrhem limitů, které je nutno dodržet.

Popis a vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina, bez chuti.

Zkoušky na čistotu

Kysele nebo zásaditě reagující látky. K 10 ml zkoušené čerstvě převařené a ochlazené vody v kádince z borokřemičitého skla se přidá 0,05 ml *červeně methylové RS;* roztok není červený. K 10 ml zkoušené vody se přidá 0,1 ml *modři bromthymolové RS1;* roztok není modrý.

Oxidovatelné látky. Ke 100 ml se přidá 10 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, 0,1 ml *manganistanu draselného 0,02 mol/l VS* a vaří se 5 min; roztok zůstane slabě růžový.

Celkový volný chlor. Do 125ml zkumavky (*A*) se postupně převede 5 ml *tlumivého roztoku o pH 6,5*, 5 ml *diethylfenylendiamoniumsulfatu RS* a 1 g *jodidu draselného R*. Do druhé zkumavky (*B*) se postupně převede 5 ml *tlumivého roztoku o pH 6,5* a 5 ml *diethylfenylendiamoniumsulfatu RS.* Pokud možno současně se přidá do zkumavky *A* 100 ml zkoušené vody a do zkumavky *B* porovnávací roztok připravený takto: k 1 ml roztoku *jodičnanu draselného R* (10 mg/l) se přidá 1 g *jodidu draselného R*, 1 ml *kyseliny sírové zředěné RS*, nechá se 1 min stát, pak se přidá 1 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a zředí se na 100 ml *vodou R*. Zbarvení směsi se zkoušenou vodu není intenzivnější než zbarvení směsi porovnávacího roztoku (0,1 μg/ml).

Chloridy (*2.4.4*). 1 ml se zředí *vodou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na chloridy (50 μg/ml).

Fluoridy. K 50 ml se přidá 10 ml *tlumivého roztoku jantaranového o pH 4,6*, 10 ml *kyseliny aminomethylalizarindioctové RS*, 5 ml roztoku *dusičnanu lanthanitého R* (0,4 g/l) a 20 ml *acetonu R*. Po každém přidání se směs zamíchá a nakonec se zředí *vodou R* na 100 ml. Nechá se 1 h stát ve tmě. Zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku současně stejným způsobem připraveného za použití směsi 1 ml základního *roztoku fluoridů (10 μg F/ml)* a 49 ml *vody R* (0,2 μg/ml).

Dusičnany. 2 ml se zředí *vodou prostou dusičnanů R* na 100 ml. 5 ml tohoto roztoku se převede do zkumavky umístěné v ledové lázni, přidá se 0,4 ml roztoku *chloridu draselného R* (100 g/l) a 0,1 ml *difenylaminu RS* a potom se přidává po kapkách a za třepání 5 ml *kyseliny sírové R*. Zkumavka se přenese do vodní lázně teplé 50 °C a ponechá se v ní 15 min. Modré zbarvení roztoku není intenzivnější než zbarvení porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití směsi 0,1 ml základního *roztoku dusičnanů (2 μg NO_3/ml)* a 4,9 ml *vody prosté dusičnanů R* (2 μg/ml).

Sírany (*2.4.13*). 3 ml se zředí *vodou destilovanou R* na 15 ml. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na sírany (50 μg/ml).

Hliník (*2.4.17*). Ke 400 ml se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*. Roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (10 μg/l). Jako porovnávací roztok se použije směs 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml tlumivého *roztoku octanového o pH 6,0* a 98 ml *vody R*. Jako kontrolní roztok se použije směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 100 ml *vody R*.

Amonium. Ke 20 ml v průhledné zkumavce s plochým dnem se přidá 1 ml *tetrajodortuťnatanu draselného zásaditého RS* a nechá se 5 min stát. Roztok není zbarven intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití směsi 4 ml základního *roztoku amonia (1 μg NH_4/ml)* a 16 ml *vody prosté amoniaku R* (0,2 μg/ml). Roztok se pozoruje ve směru podélné osy zkumavky.

Vápník. Nejvýše 2 μg Ca/ml; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se zkoušená voda.
Porovnávací roztoky. Za použití základního *roztoku vápníku (400 μg Ca/ml)* se připraví porovnávací roztoky (1 μg/ml až 5 μg/ml).

Měří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového oxidačního plamene.

Hořčík. Nejvýše 2 μg Mg/ml; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií *(2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. 10 ml se zředí *vodou destilovanou R* na 100 ml.
Porovnávací roztok. Za použití základního *roztoku hořčíku (100 μg Mg/ml)* se připraví porovnávací roztoky (0,1 μg/ml až 0,5 μg/ml).

Měří se absorbance při 285,2 nm za použití hořčíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového oxidačního plamene.

Rtuť. Nejvýše 0,001 μg Hg/ml; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. K 1 litru se přidá 5 ml *kyseliny dusičné R.* Do 50ml baňky z borokřemičitého skla se zabroušenou zátkou se převede 20 ml zkoušené vody a 1 ml *kyseliny dusičné zředěné RS.* Po zamíchání se přidá 0,3 ml *bromové vody R1*. Baňka se uzavře, protřepe se, 4 h se zahřívá při 45 °C a pak se nechá ochladit. Jestliže se roztok nezbarví do žluta, přidá se 0,3 ml *bromové vody R1* a znovu se 4 h zahřívá při 45 °C. Přidá se 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku *hydroxylamonium-chloridu R* (10 g/l), zatřepe se a nechá se 20 min stát.
Porovnávací roztoky. Připraví se postupem uvedeným u zkoušeného roztoku za použití základního *roztoku rtuti (1000 μg Hg/ml)* zředěného roztokem *kyseliny dusičné R* 5% (*V/V*). Použijí se čerstvě připravené roztoky v koncentracích 0,0005 μg/ml až 0,002 μg Hg/ml.

K objemu roztoku vhodnému pro použitý přístroj se přidá *chlorid cínatý RS2* v množství odpovídajícím jedné pětině tohoto objemu. Ihned se přemístí do zařízení pro odsávání rtuťových par. Za 20 s se nechá zařízením projít proud *dusíku R* jako nosného plynu.

Měří se absorbance při 253,7 nm za použití rtuťové lampy s dutou katodou nebo výbojky jako zdroje záření a atomizéru, který umožní, aby rtuť mohla přejít do formy studené páry, použije-li se systém bez plamene.

Těžké kovy *(2.4.8)*. 150 ml se zahřívá v odpařovací misce na vodní lázni, až se objem zmenší na 15 ml. 12 ml tohoto roztoku vyhovuje limitní zkoušce A na těžké kovy (0,1 μg/ml). Porovnávací roztok se připraví za použití *roztoku olova (1 μg Pb/ml)*.

Draslík. Nejvýše 2 μg K/ml; stanoví se atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok (a). 50,0 ml se zředí *vodou destilovanou R* na 100 ml. Tento roztok se použije pro stanovení. Jestliže obsah draslíku je větší než 0,75 mg/l, zředí se zkoušená voda dle potřeby *vodou destilovanou R.*
Zkoušený roztok (b). Použije se 50,0 ml zkoušené vody nebo, jestliže je to nutné, vody zředěné, jak je uvedeno u zkoušeného roztoku (a). Přidá se 1,25 ml základního *roztoku draslíku (20 μg K/ml)* a zředí se *vodou destilovanou R* na 100,0 ml.
Porovnávací roztoky. Za použití základního *roztoku draslíku (20 μg K/ml)* se připraví porovnávací roztoky o koncentraci 0 μg/ml; 0,25 μg/ml; 0,50 μg/ml; 0,75 μg/ml a 1 μg/ml.

Měří se intenzita emise při 766 nm.

Obsah draslíku vyjádřený v μg/ml, se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{p \cdot n_1 \cdot 0,5}{n_2 - n_1},$$

v němž značí:

p - faktor ředění, které bylo použito při přípravě zkoušeného roztoku (a),

n_1 - naměřenou hodnotu u zkoušeného roztoku (a),

n_2 - naměřenou hodnotu u zkoušeného roztoku (b).

Sodík. Nejvýše 50 μg Na/ml; stanoví se atomovou emisní spektrometrií (*2.2.22, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Použije se zkoušená voda. Jestliže obsah sodíku je vyšší než 10 mg na litr, ředí se *vodou destilovanou R* tak, aby koncentrace byla vhodná pro použitý přístroj.

Porovnávací roztoky. Za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)* se připraví porovnávací roztoky 0 μg/ml; 2,5 μg/ml; 5,0 μg/ml; 7,5 μg/ml a 10 μg/ml.

Měří se intenzita emise při 589 nm.

Zinek. Nejvýše 0,1 μg Zn/ml; stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*). Zařízení k odběru vzorků a k analýze musí být prosto zinku nebo ho nesmí v podmínkách zkoušky uvolňovat.

Zkoušený roztok. Použije se zkoušená voda.

Porovnávací roztoky. Za použití základního *roztoku zinku (100 μg Zn/ml)* se připraví porovnávací roztoky o koncentraci 0,05 μg až 0,15 μg Zn/ml.

Měří se absorbance při 213,9 nm za použití zinkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového oxidačního plamene.

Mikrobiální znečištění (*2.6.12)*. Nejvýše 10^2 živých mikroorganismů v mililitru. Stanoví se plotnovou metodou.

Bakterální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v mililitru.

Solutiones ad peritonealem dialysim

Roztoky pro peritoneální dialýzu

Jsou to roztoky určené k intraperitoneálnímu podání. Obsahují ionty v přibližně stejné koncentraci jako plazma a proměnlivá množství glukosy.

Roztoky pro peritoneální dialýzu jsou dodávány:

- v pevných nebo polopevných plastových obalech,
- v pružných plastových obalech se spojovací pomůckou a s vnějším zabezpečeným obalem, jsou plněny méně než jmenovitý objem obalu,
- ve skleněných obalech.

Obaly a uzávěry vyhovují požadavkům pro obaly určené pro přípravky k parenterálnímu použití (*3.2.1*) a (*3.2.2*).

Používají se roztoky různého složení. Koncentrace jednotlivých látek v litru roztoku jsou obvykle v následujících rozmezích:

Tab. 1.

	Vyjádřeno v milimolech	Vyjádřeno v miliekvivalentech
sodík	125 - 150	125 - 150
draslík	0 - 4,5	0 - 4,5
vápník	0 - 2,5	0 - 5,0
hořčík	0,25 - 1,5	0,50 - 3,0
octan nebo mléčnan	30 - 60	30 - 60
chloridy	90 - 120	90 - 120
glukosa	25 - 250	

K roztokům se nepřidávají antioxidancia, jako disiřičitan, pokud není uvedeno a schváleno jinak.

Zkoušky totožnosti

Podle složení se provádějí následující zkoušky (*2.3.1*):
- draslík; zkouška (b),
- vápník; zkouška (a),
- sodík; zkouška (b),
- chloridy; zkouška (a),
- octany: do zkumavky se zátkou, v níž je upevněná zahnutá trubička, se převede 5 ml zkoušeného přípravku a přidá se 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R.* Zahřívá se a zachytí se několik mililitrů destilátu, ve kterém se provede zkouška (b) na octany,
- mléčnany;
- hořčík; k 0,1 ml *žluti titanové RS* se přidá 10 ml *vody R*, 2 ml zkoušeného přípravku a 1 ml *hydroxidu sodného 1 mol/l RS*, vznikne růžové zbarvení,
- glukosa; k 5 ml zkoušeného přípravku se přidají 2 ml *hydroxidu sodného zředěného RS* a 0,05 ml *síranu měďnatého RS;* roztok je modrý a čirý. Zahřeje se k varu; vznikne objemná červená sraženina.

Zkoušky

Vzhled roztoku. Zkoušený přípravek je čirý (*2.2.1*) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok $Ž_4$ *(2.2.2, Metoda I).*

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,0 až 6,5; měří se zkoušený přípravek.

Hydroxymethylfurfural. K objemovému množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu 25 mg glukosy se přidá 5,0 ml roztoku *p-toluidinu R* (100 g/l) v *2-propanolu R* obsahujícím 10 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 1,0 ml roztoku *kyseliny barbiturové R* (5 g/l). Směs se nechá 2 min až 3 min stát; absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) měřená při 550 nm není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem obsahujícího 10 μg *hydroxymethylfurfuralu R* ve stejném objemu jako zkoušený přípravek.

Hliník (*2.4.17*). Ke 400 ml zkoušeného přípravku, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 6,0, se přidá 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0;* roztok vyhovuje limitní zkoušce na hliník (15 μg/l). Porovnávací roztok se připraví za použití 3 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)*, 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 9 ml *vody R.* Připraví se kontrolní roztok, kterým je směs 10 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 6,0* a 10 ml *vody R.*

Kontaminace částicemi. S 50 ml zkoušeného přípravku se provede zkouška na částice pod hranicí viditelnosti (*2.9.19*).

Tab. 2.

Velikost částic	větší než 5 μm	větší než 25 μm
Nejvyšší počet částic v mililitru	100	5

Využitelný objem (*2.9.17*). Vyhovuje zkoušce předepsané pro infuzní přípravky.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 0,25 m.j. endotoxinu v mililitru.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Zkoušené přípravky, u kterých nelze provést validovanou zkoušku na bakteriální endotoxiny, vyhovují zkoušce na pyrogenní látky. Vstřikuje se 10 ml roztoku na kilogram hmotnosti králíka.

Stanovení obsahu

Sodík. 97,5 % až 102,5 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda II*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* tak, aby jeho koncentrace byla vhodná pro stanovení na použitém přístroji.

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku sodíku (200 μg Na/ml)*.

Měří se absorbance při 589,0 nm za použití sodíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Draslík. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* tak, aby koncentrace byla vhodná pro stanovení na použitém přístroji. Ke 100 ml roztoku se přidá 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (22 g/l).

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku draslíku (100 μg K/ml)*. Ke 100 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 10 ml roztoku *chloridu sodného R* (22 g/l).

Měří se absorbance při 766,5 nm za použití draslíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Vápník. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* na koncentraci, která je vhodná pro stanovení na použitém přístroji.

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku vápníku (400 μg Ca/ml)*.

Měří se absorbance při 422,7 nm za použití vápníkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Hořčík. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Stanoví se atomovou absorpční spektrometrií (*2.2.23, Metoda I*).

Zkoušený roztok. Je-li třeba, zředí se zkoušený přípravek *vodou R* na koncentraci, která je vhodná pro stanovení na použitém přístroji.

Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku hořčíku (100 μg Mg/ml)*.

Měří se absorbance při 285,2 nm za použití hořčíkové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a vzduch-acetylenového nebo vzduch-propanového plamene.

Celkové chloridy. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. Přesně odměřený objem zkoušeného přípravku odpovídající asi 60 mg chloridového iontu se zředí *vodou R* na 50 ml. Přidá se 5 ml *kyseliny dusičné zředěné RS*, 25,0 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* a 2 ml *dibutylftalatu R*. Po protřepání se přidají 2 ml *síranu amonno-železitého RS2* jako indikátoru a titruje se *thiokyanatanem amonným 0,1 mol/l VS* do červenožlutého zbarvení.

1 ml *dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l VS* odpovídá 3,545 mg Cl.

Octany. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. K množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu asi 0,7 mmol octanu se přidá 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1 mmol octanu.

Mléčnany. 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství. K množství zkoušeného přípravku odpovídajícímu 0,7 mmol mléčnanu se přidá 10,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l VS* a 50 ml *acetonitrilu R* a titruje se *hydroxidem sodným 0,1 mol/l VS* za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (*2.2.20*). Odečte se spotřeba mezi dvěma inflexními body.

1 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l VS* odpovídá 0,1 mmol mléčnanu.

Redukující cukry (vyjádřeno jako glukosa bezvodá). 95,0 % až 105,0 % deklarovaného množství glukosy. Do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou se převede objemové množství zkoušeného přípravku odpovídající 25 mg glukosy a přidá se 25,0 ml *citronanu měďnatého RS* a několik zrnek pemzy. Zahřívá se 2 min pod zpětným chladičem k varu a potom se přesně 10 min vaří. Po ochlazení se přidají 3 g *jodidu draselného R* rozpuštěného ve 3 ml *vody R* a opatrně po malých dávkách se přidává 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* (25%). Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/l VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace. Provede se slepá zkouška s 25,0 ml *vody R*.

Obsah redukujících cukrů se vyjádří jako glukosa bezvodá ($C_6H_{12}O_6$) za použití tabulky 3.

Tab. 3.

Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* (ml)	Glukosa bezvodá (mg)
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3

Uchovávání

Při teplotě nad 4 °C.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- složení přípravku vyjádřené v g/l a v mmol/l,
- vypočítaná hodnota osmolality vyjádřená v mosmol/l,

- jmenovitý objem přípravku v obalu,
- zda je přípravek prostý bakteriálních endotoxinů nebo zda je roztok prostý pyrogenních látek,
- podmínky uchovávání,
- upozornění, že přípravek není určený pro intravenózní podání,
- upozornění, že nespotřebovaná část přípravku se odstraní.

Solutiones anticoagulantes et sanguinem humanum conservantes

Antikoagulační a konzervační roztoky pro lidskou krev

Jsou to sterilní roztoky prosté pyrogenních látek. Připravují se rozpuštěním látek ve vodě na injekci, filtrací, rozplněním do konečných obalů a sterilizací. Obsah dihydrátu citronanu sodného ($C_6H_5Na_3O_7 . 2H_2O$), monohydrátu glukosy ($C_6H_{12}O_6 . H_2O$) nebo glukosy bezvodé ($C_6H_{12}O_6$) a dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$) je 95,0 % až 105,0 % množství uvedeného ve složení deklarovaném tímto článkem. Obsah monohydrátu kyseliny citronové ($C_6H_8O_7 . H_2O$) nebo kyseliny citronové bezvodé ($C_6H_8O_7$) je 90,0 % až 105,0 % množství uvedeného ve složení deklarovaném tímto článkem.

Za souhlasu oprávněné autority může být použito i jiné složení roztoku ke konzervaci červených krvinek; názvy látek a jejich množství se uvede v označení na obalu.

Antikoagulační a konzervační roztoky pro lidskou krev se uchovávají ve vzduchotěsných zabezpečených obalech ze skla (*3.2.1*) nebo z plastů (*3.2.3*).

Antikoagulační roztoky kyselina-citronan-glukosa (ACD)

	A	B
Natrii citras dihydricus	22,0 g	13,2 g
Acidum citricum monohydricum	8,0 g	4,8 g
nebo Acidum citricum	7,3 g	4,4 g
Glucosum monohydricum[1)]	24,5 g	14,7 g
nebo *Glucosum*[1)]	22,3 g	13,4 g
Aqua pro injectione ad	1000,0 ml	1000,0 ml
Na 100 ml krve se použije	15,0 ml	25,0 ml

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina, prakticky prostá částic.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R.*

[1)] Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Glucosum monohydricum* nebo *Glucosum*.

Zkoušený roztok. 2 ml zkoušeného přípravku (složení A) nebo 3 ml zkoušeného přípravku (složení B) se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) na 100 ml.
Porovnávací roztok (a). 10 mg *glukosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.
Porovnávací roztok (b). 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL,* 10 mg *fruktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené skvrny se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla musí být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi složené z 5 ml *kyseliny sírové R* a 95 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

B. Ke 2 ml se přidá 5 ml *citronanu měďnatého RS* a zahřeje se k varu; vznikne oranžová sraženina a zbarvení roztoku se změní na žluté.

C. Ke 2 ml (složení A) se přidají 3 ml *vody R* nebo ke 4 ml (složení B) se přidá 1 ml *vody R;* roztoky vyhovují zkoušce na citronany (*2.3.1*).

D. 0,5 ml vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,7 až 5,3; měří se zkoušený přípravek.

Hydroxymethylfurfural. Ke 2,0 ml zkoušeného přípravku se přidá 5,0 ml roztoku *p-toluidinu R* (100 g/l) v *2-propanolu R* obsahujícím 10 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 1,0 ml roztoku *kyseliny barbiturové R* (5 g/l). Směs se nechá 2 min až 3 min stát; absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) měřená při 550 nm není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem s použitím 2,0 ml roztoku obsahujícího 5 μg/ml *hydroxymethylfurfuralu R* (pro složení A) a 3 μg/ml *hydroxymethylfurfuralu R* (pro složení B).

Sterilita (*2.6.1)*. Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogennní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Ředí se roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) prostým pyrogenních látek na roztok obsahující asi 5 g/l citronanu sodného. Vstřikuje se 10 ml zředěného roztoku na 1 kg hmotnosti králíka.

Stanovení obsahu

Kyselina citronová. K 10,0 ml (složení A) nebo k 20,0 ml (složení B) se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,2 mol/l VS* do růžového zbarvení.

1 ml *hydroxidu sodného 0,2 mol/l VS* odpovídá 14,01 mg $C_6H_8O_7 . H_2O$ nebo 12,81 mg $C_6H_8O_7$

Citronan sodný. Chromatografická kolona délky 0,1 m a vnitřního průměru 10 mm se naplní *katexem silně kyselým R* (300 μm až 840 μm). Na povrchu náplně se udržuje stále 1cm vrstva kapaliny. Kolona se promyje 50 ml deionizované *vody R* při průtokové rychlosti 12 ml/min až 14 ml/min.

10,0 ml zkoušeného přípravku (složení A) nebo 15,0 ml zkoušeného přípravku (složení B) se zředí v kádince asi na 40 ml deionizovanou *vodou R* a potom se přenese do zásobníku kolony, přičemž se kádinka promyje třikrát několika mililitry deionizované *vody R*, které se přidají do zásobníku kolony. Roztok se nechá protékat kolonou rychlostí 12 ml/min až 14 ml/min a eluát se zachytává. Kolona se promyje dvakrát 30 ml a jednou 50 ml deionizované *vody R*. Kolona se může použít pro tři stanovení před regenerací třínásobným objemem (kolony) *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Spojený eluát s promývací tekutinou (asi 150 ml) se titruje *hydroxidem sodným 0,2 mol/l VS* s použitím 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* jako indikátoru.

Obsah citronanu sodného v g/l se vypočítá podle vzorců:

pro složení A: $1{,}961n - 1{,}40C$ nebo $1{,}961n - 1{,}53C'$,

pro složení B: $1{,}307n - 1{,}40C$ nebo $1{,}307n - 1{,}53C'$,

v nichž značí:

n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,2 mol/l VS* v ml,

C - nalezený obsah monohydrátu kyseliny citronové v g/l, viz zkouška Kyselina citronová,

C'- nalezený obsah bezvodé kyseliny citronové v g/l, viz zkouška Kyselina citronová.

Redukující cukry. 5,0 ml zkoušeného přípravku (složení A) nebo 10,0 ml zkoušeného přípravku (složení B) se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 25,0 ml těchto roztoků se převede do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou a přidá se 25,0 ml *citronanu měďnatého RS1* a několik kousků porézního materiálu. Zahřívá se 2 min pod zpětným chladičem k varu a potom se přesně 10 min vaří. Po ochlazení se přidají 3 g *jodidu draselného R* rozpuštěného ve 3 ml *vody R* a opatrně po malých dávkách se přidává 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* (25%). Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/ VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace(n_1 ml). Provede se slepá zkouška s 25,0 ml *vody R* (n_2 ml).

Obsah redukujících cukrů se vyjádří jako glukosa bezvodá nebo jako monohydrát glukosy, jak je třeba, za použití tabulky 1.

Tab. 1.

Spotřeba *thiosíranu sodného 0,1 mol/l VS* (n_1 - n_2 ml)	Glukosa bezvodá (mg)	Glukosa monohydrát (mg)
8	19,8	21,6
9	22,4	24,5
10	25,0	27,4
11	27,6	30,2
12	30,3	33,1
13	33,0	36,1
14	35,7	39,0
15	38,5	42,1
16	41,3	45,2

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zabezpečených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:

- složení a objem přípravku,
- nejvyšší množství krve, které lze odebrat do obalu.

Antikoagulační roztoky citronan-fosforečnan-glukosa (CPD)

Natrii citras dihydricus	26,3 g
Acidum citricum monohydricum	3,27 g
nebo *Acidum citricum*	2,99 g
Glucosum monohydricum[2)]	25,5 g
nebo *Glucosum*[2)]	23,2 g
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus	2,51 g
Aqua pro injectione	ad 1000,0 ml
Na 100 ml krve se použije	14,0 ml

Vlastnosti

Čirá bezbarvá nebo slabě nažloutlá kapalina, prakticky prostá částic.

Zkoušky totožnosti

A. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)* za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 2 ml zkoušeného přípravku se zředí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) na 100 ml.

Porovnávací roztok (a). 10 mg *glukosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Porovnávací roztok (b). 10 mg *glukosy CRL,* 10 mg *laktosy CRL,* 10 mg *fruktosy CRL* a 10 mg *sacharosy CRL* se rozpustí ve směsi objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (2 + 3) a zředí se stejnou směsí na 20 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně po 2 μl každého roztoku a nanesené skvrny se důkladně usuší. Vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R*, *methanolu R*, *kyseliny octové bezvodé R* a *dichlorethanu R* (10 + 15 + 25 + 50) po dráze 15 cm. Rozpouštědla musí být odměřena přesně, i malý přebytek vody může způsobit zákal. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu. Vyvíjení se ihned opakuje v čerstvě připravené směsi rozpouštědel. Vrstva se usuší v proudu teplého vzduchu, rovnoměrně se postříká roztokem 0,5 g *thymolu R* ve směsi složené z 5 ml *kyseliny sírové R* a 95 ml *lihu 96% R* a zahřívá se 10 min při 130 °C. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá polohou, zbarvením a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Zkoušku lze hodnotit, jestliže na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) jsou čtyři zřetelně oddělené skvrny.

B. Ke 2 ml se přidá 5 ml *citronanu měďnatého RS* a zahřeje se k varu; vznikne oranžová sraženina a zbarvení roztoku se změní na žluté.

C. Ke 2 ml se přidají 3 ml *vody R*. Tento roztok vyhovuje zkoušce na citronany (*2.3.1*).

D. 1 ml vyhovuje zkoušce (b) na fosforečnany (*2.3.1*).

E. 0,5 ml vyhovuje zkoušce (b) na sodík (*2.3.1*).

[2)] Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Glucosum monohydricum* nebo *Glucosum*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 5,3 až 5,9; měří se zkoušený přípravek.

Hydroxymethylfurfural. Ke 2,0 ml zkoušeného přípravku se přidá 5,0 ml roztoku *p-toluidinu R* (100 g/l) v *2-propanolu R* obsahujícím 10 % *(V/V) kyseliny octové ledové R* a 1,0 ml roztoku *kyseliny barbiturové R* (5 g/l). Směs se nechá 2 min až 3 min stát; absorbance tohoto roztoku (*2.2.25*) měřená při 550 nm není větší než absorbance porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 2,0 ml roztoku obsahujícího 5 μg/ml *hydroxymethylfurfuralu R.*

Sterilita (*2.6.1)*. Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogennní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky. Ředí se roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) prostým pyrogenních látek na roztok obsahující asi 5 g/l citronanu sodného. Vstřikuje se 10 ml zředěného roztoku na 1 kg hmotnosti králíka.

Stanovení obsahu

Dihydrogenfosforečnan sodný. 10,0 ml se zředí *vodou R* na 100,0 ml. K 10,0 ml tohoto roztoku se přidá 10,0 ml *zkoumadla molybdenanvanadičného R*, promíchá se a nechá se 30 min stát při 20 °C až 25 °C. Současně se stejným způsobem připraví porovnávací roztok za použití 10,0 ml základního roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (0,219 g/l). Měří se absorbance (*2.2.25*) obou roztoků při 450 nm proti kontrolnímu roztoku připravenému současně stejným způsobem za použití 10 ml *vody R*. Vypočítá se obsah dihydrogenfosforečnanu sodného (*P*) v g/l podle vzorce:

$$\frac{11{,}46 \ . \ C \ . \ A_1}{A_2} \ ,$$

v němž značí:
C - množství *dihydrogenfosforečnanu draselného R* v základním roztoku v g/l,
A_1 - absorbanci zkoušeného roztoku,
A_2 - absorbanci porovnávacího roztoku.

Kyselina citronová. K 20,0 ml se přidá 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* a titruje se *hydroxidem sodným 0,2 mol/l VS.*

Vypočítá se obsah monohydrátu kyseliny citronové (*C*) nebo kyseliny citronové bezvodé (*C'*) v g/l podle příslušného vzorce:

$C = 0{,}7005n - 0{,}4490P$,

$C' = 0{,}6404n - 0{,}4105P$,

v němž značí:
n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,2 mol/l VS* v ml,
P - zjištěný obsah dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného v g/l, viz zkouška Dihydrogenfosforečnan sodný.

Citronan sodný. Chromatografická kolona délky 100 mm a vnitřního průměru 10 mm se naplní *katexem silně kyselým R* (300 μm až 840 μm). Na povrchu náplně se udržuje stále 1cm vrstva kapaliny. Kolona se promyje 50 ml deionizované *vody R* při průtokové rychlosti 12 ml/min až 14 ml/min.

10,0 ml zkoušeného přípravku se zředí v kádince asi na 40 ml deionizovanou *vodou R* a potom se přenese do zásobníku kolony, přičemž se kádinka promyje třikrát několika mililitry deionizované *vody R*, které se přidají do zásobníku kolony. Roztok se nechá protékat kolonou rychlostí 12 ml/min až 14 ml/min a eluát se zachytává. Kolona se promyje dvakrát 30 ml a jednou 50 ml deionizované

vody R. Kolona se může použít pro tři stanovení před regenerací třínásobným objemem (kolony) *kyseliny chlorovodíkové zředěné RS*. Spojený eluát s promývací tekutinou (asi 150 ml) se titruje *hydroxidem sodným 0,2 mol/l VS* za použití 0,1 ml *fenolftaleinu RS1* jako indikátoru.

Obsah citronanu sodného v g/l se vypočítá podle příslušného vzorce:

$1{,}961n - 1{,}257P - 1{,}40C$,

$1{,}961n - 1{,}257P - 1{,}53C'$,

v němž značí:

n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,2 mol/l VS* v ml,

P - nalezený obsah dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného v g/l, viz zkouška Dihydrogenfosforečnan sodný,

C - nalezený obsah monohydrátu kyseliny citronové v g/l, viz zkouška Kyselina citronová,

C' - nalezený obsah bezvodé kyseliny citronové v g/l, viz zkouška Kyselina citronová.

Redukující cukry. 5,0 ml se zředí *vodou R* na 100,0 ml. 25,0 ml tohoto roztoku se převede do 250ml kuželové baňky se zabroušenou zátkou a přidá se 25,0 ml *citronanu měďnatého RS1* a několik kousků porézního materiálu. Zahřívá se 2 min pod zpětným chladičem k varu a potom se přesně 10 min vaří. Po ochlazení se přidají 3 g *jodidu draselného R* rozpuštěného ve 3 ml *vody R* a opatrně po malých dávkách se přidává 25 ml roztoku *kyseliny sírové R* (25%). Titruje se *thiosíranem sodným 0,1 mol/ VS* za použití *škrobu RS* jako indikátoru přidaného před koncem titrace(n_1 ml). Provede se slepá zkouška s 25,0 ml *vody R* (n_2 ml).

Obsah redukujících cukrů se vypočítá jako glukosa bezvodá nebo jako monohydrát glukosy podle potřeby s použitím tabulky 1.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných zabezpečených obalech, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:

- složení a objem přípravku,
- nejvyšší množství krve, které lze odebrat do obalu.

† Somatropinum pro iniectione

Somatropin pro injekci

Je to lyofilizovaný sterilní přípravek obsahující bílkovinu se strukturou (191 aminokyselinových zbytků) hlavní složky růstového hormonu produkovaného lidskou hypofýzou. Obsahuje 89,0 % až 105,0 % deklarovaného obsahu somatropinu [3)] ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$). Vyhovuje požadavkům článků *Parenteralia* a *Producta ab ADN recombinante*.

[3)] 1 mg bezvodého somatropinu ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) odpovídá 3,0 m.j. biologické účinnosti.

Výroba

Připravuje se ze somatropinu nebo z roztoku somatropinu nebo biotechnologicky metodou založenou na rekombinaci DNK (rDNK), při které je injekční přípravek připravován bez izolace pevných nebo tekutých meziproduktů. V posledním případě se při vývoji výroby prokáže vhodnou validovanou metodou stanovení biologické účinnosti založenou na stimulaci růstu a schválenou oprávněnou autoritou, že látka získaná daným výrobním postupem má biologickou účinnost nejméně 2,5 m.j. v miligramu. Přečištěný přípravek, popř. s přidanými tlumivými roztoky nebo stabilizujícími přísadami, se filtruje filtrem zachycujícím bakterie, asepticky se rozplňuje do sterilních nádob ze skla třídy I (*3.2.1*) a provede se lyofilizace. Nádoby se ihned uzavřou tak, aby přípravek byl chráněn před mikrobiální kontaminací a vlhkostí.

Před propuštěním se na každé šarži provedou následující zkoušky, pokud oprávněná autorita neudělí výjimku:

Bílkoviny hostitelské buňky. Požadavek stanoví oprávněná autorita.

DNK hostitelské buňky a vektoru. Požadavek stanoví oprávněná autorita.

Pokud se somatropin pro injekci připravuje ze somatropinu nebo z roztoku somatropinu a byla vydána výjimka oprávněnou autoritou, nemusí výrobce injekčního přípravku provádět zkoušku totožnosti C.

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý prášek.

Zkoušky totožnosti

A. Vyhodnotí se elektroforeogramy ze zkoušky Izoelektrická fokusace. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá hlavní zóna polohou hlavní zóně na elektroforeogramu porovnávacího roztoku. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (c) je pouze jedna hlavní zóna.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Příbuzné bílkoviny. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

C. Provede se peptidové mapování.

Zkoušený roztok. Připraví se roztok zkoušeného přípravku v *tlumivém roztoku trisacetatovém o pH 8,5* tak, aby obsahoval 2,0 mg v mililitru. Asi 1,0 ml takto připraveného roztoku se přenese do zkumavky z vhodného materiálu, např. polypropylenu. Připraví se čerstvý roztok *trypsinu pro peptidové mapování R* (1 g/l) ve vhodném tlumivém octanovém roztoku o pH asi 5,0 a 30 µl se přidá k roztoku zkoušené látky. Zkumavka se uzavře a vloží se na 4 h do vodní lázně 37 °C teplé. Potom se zkumavka vyjme z vodní lázně a ihned se probíhající reakce přeruší přidáním 200 µl *kyseliny octové ledové R.*

Porovnávací roztok. Současně se za stejných podmínek připraví porovnávací roztok s tím rozdílem, že zkoušený přípravek se nahradí *somatropinem CRL.*

Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 µm až 10 µm),

- mobilní fáze, která je směsí mobilní fáze A a mobilní fáze B, které se připraví následujícím způsobem:
  - *mobilní fáze A* - 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* se zředí *vodou R* na 1000 ml,
  - *mobilní fáze B* - ke 100 ml *vody R* se přidá 1 ml *kyseliny trifluoroctové R* a zředí se *acetonitrilem R* na 1000 ml.

  Průtoková rychlost je 1 ml/min. Použije se následující gradient:

Čas (min)	Mobilní fáze A % *(V/V)*	Mobilní fáze B % *(V/V)*
0	100	0
20	80	20
40	75	25
65	50	50

- detektoru spektrofotometrického, 214 nm.

  Kolona se nejméně 15 min ustaluje mobilní fází A. Potom se kolona promývá za použití výše uvedeného gradientu a pokračuje se v promývání po dobu 5 min s průběžně se zvyšující koncentrací mobilní fáze B až na 80 %. Potom se kolona opět promývá mobilní fází A po dobu 15 min. Nastříkne se odděleně po 100 µl obou roztoků. Na konci gradientové eluce a před dalším nástřikem se zvýší koncentrace mobilní fáze B na 80 % v průběhu 5 min a poté se kolona 15 min promývá mobilní fází A.

  Chromatogram zkoušeného roztoku odpovídá chromatogramu porovnávacího roztoku. Zkoušku lze hodnotit, jestliže chromatogramy jednotlivých roztoků kvalitativně odpovídají porovnávacímu chromatogramu dodávanému se *somatropinem CRL*.

D. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Stanovení obsahu. Retenční čas hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá retenčnímu času hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b).

Zkoušky na čistotu

Příbuzné bílkoviny. Provede se kapalinová chromatografie (*2.2.29*).

Zkoušený roztok (a). Připraví se roztok zkoušeného přípravku v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg somatropinu.

Zkoušený roztok (b). 100 µl zkoušeného roztoku (a) se zředí *tlumivým roztokem trometamolovým o pH 7,5 (1)* na 1,5 ml.

Porovnávací roztok (a). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg.

Porovnávací roztok (b). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v *tlumivém roztoku trometamolovém o pH 7,5 (1)* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg. K takto připravenému roztoku se přidá čerstvě připravený koncentrovaný roztok *peroxidu vodíku R* tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 0,01 % (*V/V*) a nechá se 5 h stát při 4 °C. Potom se na mililitr roztoku přidá 4,5 mg *L-methioninu R*.

Roztoky se uchovávají při teplotě 2 °C až 8 °C a použijí se do 24 h. Pokud se používá automatický dávkovač, je nutno jej udržovat při teplotě 2 °C až 8 °C.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem butylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *1-propanolu R* a *tlumivého roztoku trometamolového o pH 7,5 (1)* (29 + 71), s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min,
- detektoru spektrofotometrického, 220 nm.

Teplota kolony se udržuje na 45 °C.

Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (a). Je-li třeba, upraví se koncentrace 1-propanolu v mobilní fázi tak, aby retenční čas hlavního píku byl (33 ± 3) min. Nastříkne se 20 μl porovnávacího roztoku (b). Určí se píky pomocí porovnávacího chromatogramu dodávaného se *somatropinem CRL*. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozlišení mezi somatropinem a jeho oxidačním produktem je nejméně 1,0.

Nastříkne se po 20 μl všech roztoků a zaznamenávají se chromatogramy po dobu nejméně 50 min. Na chromatogramu zkoušeného roztoku (a) plocha žádného píku, kromě hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (6,67 %); součet ploch všech píků, kromě hlavního píku, není větší než dvojnásobek plochy hlavního píku na chromatogramu zkoušeného roztoku (b) (13 %). Nepřihlíží se k píku rozpouštědla.

Dimer a příbuzné látky s vyšší molekulovou hmotností. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*), jak je popsána ve zkoušce Stanovení obsahu.

Nastříkne se 50 μl porovnávacího roztoku (a). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku dosahovala 50 % až 70 % celé stupnice zapisovače. Rozlišení dané poměrem výšky minima mezi píky monomeru a dimeru k výšce dimeru je menší než 0,6 (relativní retenční časy vztažené k monomeru jsou přibližně 0,94 pro dimer a 0,87 pro polymery). Několikrát se nastříkne porovnávací roztok (a) (nejméně třikrát); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchylka plochy hlavního píku je nejvýše 2,5 %.

Nastříkne se po 50 μl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (a). Na chromatogramu zkoušeného roztoku součet ploch všech píků s retenčním časem menším než je retenční čas hlavního píku, není větší než plocha hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a) (6,0 %).

Izoelektrická fokusace. Provede se izoelektrická fokusace.

Zkoušený roztok (a). Připraví se roztok zkoušeného přípravku v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg.
Zkoušený roztok (b). 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) na 1,5 ml.
Zkoušený roztok (c). Smíchá se 0,1 ml zkoušeného roztoku (a) a 0,1 ml porovnávacího roztoku.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok *somatropinu CRL* ve *vodě R* tak, aby v mililitru obsahoval 2,0 mg.
Roztok pro kalibraci izoelektrického bodu o rozmezí pH 2,5 až 6,5. Připraví se a použije podle návodu výrobce.

Se zařízením se pracuje podle návodu výrobce. Izoelektrická fokusace se provádí na hotových deskách s vrstvou gelu o rozměrech 245 mm x 110 mm x 1 mm a pH v rozmezí 4,0 až 6,5. Na vrstvu gelu se nanese odděleně po 15 μl každého roztoku. Jako anodický roztok se použije roztok *kyseliny glutamové R* (147,1 g/l) v roztoku *kyseliny fosforečné R* (50 g H_3PO_4/l) a jako katodický roztok se použije roztok *β-alaninu R* (89,1 g/l). Pracovní podmínky se nastaví na 2000 V a 25 mA. Nechá se proběhnout fokusace při konstantním napětí po dobu 2,5 h. Vrstva gelu se ponoří na 30 min do roztoku obsahujícího *kyselinu trichloroctovou R* (115 g/l) a *kyselinu sulfosalicylovou R* (34,5 g/l) a potom na 5 min do směsi objemových dílů *kyseliny octové R*, *ethanolu R* a deionizované

vody R (8 + 25 + 67) (odbarvovací roztok). Vrstva gelu se vybarvuje ponořením na 10 min do roztoku *modře kyselé 83 R* (1,15 g/l) v odbarvovacím roztoku zahřátého na 60 °C a potom se ponoří do odbarvovacího roztoku do odstranění nadbytku barviva. Zkoušku lze hodnotit, jestliže rozdělení zón roztoku pro kalibraci izoelektrického bodu odpovídá požadavkům výrobce. Na eletroforeogramu porovnávacího roztoku je viditelná hlavní zóna s izoelektrickým bodem okolo 5 a kyselejší menší zóna okolo 4,8. Na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (a) žádná zóna, kromě hlavní zóny, nepřevyšuje svou intenzitou hlavní zónu na elektroforeogramu zkoušeného roztoku (b) (6,25 %).

Voda. Nejvýše 3,0 %. Stanoví se plynovou chromatografií (*2.2.28*) za použití *methanolu bezvodého R* jako vnitřního standardu. *Použije se suché skleněné nádobí, které může mít vrstvu silikonu.*

Roztok vnitřního standardu. 15 µl *methanolu bezvodého R* se zředí *2-propanolem R1* na 100 ml.
Zkoušený roztok (a). 1,0 mg zkoušeného přípravku se suspenduje v 0,1 ml *2-propanolu R1*, 30 min se třepe a potom se odstřeďuje; použije se čirá supernatantní tekutina.
Zkoušený roztok (b). 1,0 mg zkoušeného přípravku se suspenduje v 0,1 ml roztoku vnitřního standardu, 30 min se třepe a potom se odstřeďuje; použije se čirá supernatantní tekutina.
Porovnávací roztok. 10 µl *vody R* se přidá k 50 ml roztoku vnitřního standardu.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 1 m a vnitřního průměru 2 mm naplněné *styrendivinylbenzen kopolymerem R* (180 µm až 250 µm),
- *helia pro chromatografii R* jako nosného plynu,
- tepelně vodivostního detektoru.

Teplota kolony se udržuje na 120 °C a teplota detektoru na 150 °C.

Nastříkne se zvolený objem všech roztoků. Vypočítá se obsah vody za předpokladu, že hustota vody (*2.2.5*) je při 20 °C 0,997 g/ml a odečte se množství vody obsažené v roztoku vnitřního standardu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 5 m.j. endotoxinu v miligramu účinné látky.

Stanovení obsahu

Stanoví se vylučovací chromatografií (*2.2.30*).

Zkoušený roztok. Připraví se roztok zkoušené látky v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 1,0 mg.
Porovnávací roztok (a). 300 µl zkoušeného roztoku se zředí roztokem *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) na 5,0 ml.
Porovnávací roztok (b). Připraví se roztok *somatropinu CRL* v roztoku *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l) tak, aby v mililitru obsahoval 1,0 mg.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky asi 0,25 m a vnitřního průměru 9,4 mm naplněné *silikagelem hydrofilním pro chromatografii R* jakosti vhodné pro dělení globulárních bílkovin v rozmezí molekulové hmotnosti 5000 až 60 000,
- mobilní fáze, kterou je zfiltrovaný a odplyněný roztok *hydrogenuhličitanu amonného R* (3,95 g/l), s průtokovou rychlostí 0,6 ml/min,
- detektoru spektrofotometrického, 214 nm.

Nastříkne se 50 µl porovnávacího roztoku (b). Citlivost detektoru se nastaví tak, aby výška hlavního píku dosahovala nejméně poloviny celé stupnice zapisovače. Několikrát se nastříkne porovnávací roztok (b) (nejméně třikrát); zkoušku lze hodnotit, jestliže relativní směrodatná odchyl-

ka plochy píku somatropinu je nejvýše 2,5 %. Nastřikuje se střídavě po 50 µl zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b).

Obsah se vypočítá z ploch píků na chromatogramu zkoušeného roztoku a na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) a deklarovaného obsahu $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ v *somatropinu CRL*.

Uchovávání

Ve sterilních zabezpečených obalech, při teplotě 2 °C až 8 °C.
Separandum.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- obsah somatropinu v miligramech,
- složení a objem rozpouštědla přidaného k rekonstituci,
- doba, po kterou lze rekonstituovaný roztok použít, a podmínky uchovávání po tuto dobu,
- název a množství jakýchkoliv přísad,
- teplota uchovávání,
- zda přípravek během rozpouštění nemá být protřepáván,
- účinnost v mezinárodních jednotkách.

† Stramonii pulvis normatus

Práškovaný durmanový list titrovaný

Je to práškovaný (180) list durmanu, jehož obsah alkaloidů je upraven přidáním laktosy nebo drogy s nižším obsahem alkaloidů tak, aby celkový obsah alkaloidů, počítáno jako hyoscyamin ($C_{17}H_{23}NO_3$; M_r 289,4), činil 0,23 % až 0,27 %, vztaženo na vysušenou drogu.

Vlastnosti

Droga má nepříjemný pach.
Mikroskopický popis, viz Zkouška totožnosti A.

Zkoušky totožnosti

A. Prášek je šedozelený. Pozoruje se pod mikroskopem v *chloralhydrátu RS.* Práškovaná droga je charakteristická těmito znaky: úlomky pokožky čepele listu s buňkami se stěnami mírně vlnitě zprohýbanými a s hladkou kutikulou; anizocytické a anomocytické průduchy (*2.8.3*) četnější na spodní straně listu, krycí chlupy kuželovité, jednořadé, tříbuněčné až pětibuněčné, s bradavčitými stěnami. Žláznaté chlupy krátké, paličkovité, s dvoubuněčnou až sedmibuněčnou hlavičkou. Dorziventrální mezofyl s jednou řadou palisádových buněk, houbový parenchym s drúzami šťavelanu vápenatého; kruhovitě a šroubovitě ztlustlé cévy. Vlákna a síťovitě ztlustlé cévy stonku; kulovitá pylová zrna zpravidla 60 µm až 80 µm v průměru, se třemi klíčními póry a téměř hladkou exinou. Úlomky koruny s papilózní pokožkou; úlomky semene obsahující žlutohnědé zprohýbané silnostěnné sklereidy osemení; občas krystaly a písek šťavelanu vápenatého.

Při hodnocení v *glycerolu 85% R* mohou být patrné krystalky laktosy.

B. Hodnotí se chromatogramy ze zkoušky Chromatografie, viz Zkoušky na čistotu. Hlavní skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením i velikostí hlavním skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů.

C. 1 g se protřepává 2 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS* a zfiltruje se. K filtrátu se přidá 1 ml *amoniaku 26% R* a 5 ml *vody R*. Opatrně se protřepává s 15 ml *etheru prostého peroxidických látek R* tak, aby se netvořila emulze. Vrchní vrstva se oddělí a vysuší *síranem sodným bezvodým R*. Zfiltruje se a ether se odpaří na porcelánové misce. Přidá se 0,5 ml *kyseliny dusičné R* a odpaří se na vodní lázni do sucha. Přidá se 10 ml *acetonu R* a po kapkách roztok *hydroxidu draselného* (30 g/l) v *lihu 96% R;* vznikne tmavě fialové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Chromatografie. Provede se tenkovrstvá chromatografie (*2.2.27*) za použití vrstvy *silikagelu G R*.

Zkoušený roztok. 1,0 g se protřepává 15 min s 10 ml *kyseliny sírové 0,05 mol/l RS*. Roztok se zfiltruje a filtr se promývá *kyselinou sírovou 0,05 mol/l RS* až do konečného objemu 25 ml filtrátu. Přidá se 1 ml *amoniaku 26% R* a pak se protřepává dvakrát 10 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené etherové výtřepky se vysuší *síranem sodným bezvodým R*. Zfiltruje se a filtrát se odpaří na vodní lázni do sucha. Zbytek se rozpustí v 0,5 ml *methanolu R*.

Porovnávací roztok. 50 mg *hyoscyaminiumsulfatu R* se rozpustí v 9 ml *methanolu R*. 15 mg *skopolaminiumbromidu R* se rozpustí v 10 ml *methanolu R*. 3,8 ml roztoku hyoscyaminiumsulfatu a 4,2 ml roztoku skopolaminiumbromidu se zředí *methanolem R* na 10 ml.

Na vrstvu se nanese odděleně do pruhů (20 mm x 3 mm) po 10 μl a 20 μl obou roztoků; vzdálenost mezi jednotlivými pruhy je 1 cm. Vyvíjí se směsí objemových dílů *amoniaku 26% R*, *vody R* a *acetonu R* (3 + 7 + 90) po dráze 10 cm. Vrstva se suší 15 min při 100 °C až 105 °C. Po ochlazení se postříká asi 10 ml *jodobismutitanu draselného RS2* do vzniku oranžových nebo hnědých skvrn na žlutém pozadí. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou (hyoscyamin v dolní třetině, skopolamin v horní třetině chromatogramu) a zbarvením skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku nepřevyšují velikostí skvrny na chromatogramu porovnávacího roztoku při nanášce shodných objemů. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být patrny další slabě zbarvené skvrny; při nanášce 20 μl ve střední části chromatogramu, při nanášce 10 μl v blízkosti startu. Vrstva se postříká *dusitanem sodným RS* tak, aby byla průsvitná. Pozoruje se po 15 min. Skvrny odpovídající hyoscyaminu na chromatogramech zkoušeného i porovnávacího roztoku se zbarví červenohnědě, ne však šedomodře (atropin), další skvrny již nejsou patrné.

Celkový popel (*2.4.16*). Nejvýše 20,0 %.

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (*2.8.1*). Nejvýše 4,0 %.

Ztráta sušením (*2.2.32*). Nejvýše 5,0 %; 1,000 g drogy se suší v sušárně při 100 °C až 105 °C.

Stanovení obsahu

10,00 g se navlhčí směsí složenou z 5 ml *amoniaku 17% RS*, 10 ml *lihu 96% R* a 30 ml *etheru prostého peroxidických látek R*, důkladně se promíchá. Směs se převede do vhodného perkolátoru, je-li třeba pomocí extrakční směsi, a nechá se 4 h stát. Pak se perkoluje směsí složenou z objemových dílů *chloroformu R* a *etheru prostého peroxidických látek R* (1 + 3) tak dlouho, dokud vytékající perkolát reaguje pozitivně na přítomnost alkaloidů. Několik mililitrů perkolátu se odpaří do

sucha, zbytek se rozpustí v *kyselině sírové 0,25 mol/l RS* a nepřítomnost alkaloidů se ověří *tetrajodortuťnatanem draselným RS*. Perkolát se zahustí na vodní lázni na objem asi 50 ml a převede se do dělicí nálevky pomocí *etheru prostého peroxidických látek R*. Přidá se *ether prostý peroxidických látek R* tak, aby jeho objem tvořil nejméně 2,1násobek objemu perkolátu a aby tekutina měla hustotu zřetelně nižší než voda. Protřepe se nejméně třikrát 20 ml *kyseliny sírové 0,25 mol/l RS*, je-li třeba, oddělí se vrstvy odstřeďováním. Spojené spodní vrstvy se převedou do druhé dělicí nálevky, zalkalizují se *amoniakem 17% RS* a vytřepávají se třikrát 30 ml *chloroformu R*. Ke spojeným chloroformovým výtřepkům se přidají 4 g *síranu sodného bezvodého R* a nechá se stát 30 min za občasného protřepávání. Chloroform se slije a síran sodný se promyje třikrát 10 ml *chloroformu R*. Spojené chloroformové roztoky se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se suší 15 min v sušárně při 100 °C až 105 °C. Odparek se rozpustí v několika mililitrech *chloroformu R*, přidá se 20,0 ml *kyseliny sírové 0,01 mol/l RS* a *chloroform R* se odstraní zahřátím na vodní lázni. Přidá se *červeň methylová směsný indikátor RS* a titruje se *hydroxidem sodným 0,02 mol/l VS*.

Celkový obsah alkaloidů v procentech, počítáno jako hyoscyamin $C_{17}H_{23}NO_3$, se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{57{,}88\ .\ (20\ -\ n)}{(100\ -\ d)\ .\ m}\ ,$$

v němž značí:
d - ztrátu sušením v procentech,
n - spotřebu *hydroxidu sodného 0,02 mol/l VS* v mililitrech,
m - navážku drogy v gramech.

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem.
Separandum.

Tuberculini aviarii derivatum proteinosum purificatum

Derivát purifikovaného proteinu aviárního tuberkulinu

Je to přípravek získaný ze zahřátého produktu kultivace a lýzy *Mycobacterium avium*, který má schopnost dokázat opožděnou přecitlivělost u zvířat senzibilizovaných proti mikroorganismům stejného druhu.

Výroba

Získává se z frakcí rozpustných ve vodě a připravených zahříváním ve volně proudící páře a následnou filtrací kultur *M. avium* vyrostlých v tekuté syntetické živné půdě. Účinná frakce filtrátu, kterou tvoří především bílkoviny, se izoluje srážením, promýváním a znovu se rozpouští. Může se přidat protimikrobní konzervační látka, která nevyvolává falešné pozitivní reakce, jako je např. fenol. Konečný sterilní přípravek, prostý mykobakterií,se asepticky rozplní do sterilních skleněných obalů, které se poté uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. Přípravek se může lyofilizovat.

Zkouška totožnosti, zkoušky na čistotu a stanovení účinnosti se provádějí u tekutého přípravku nebo lyofilizovaného přípravku po rozpuštění podle návodu.

Zkouška totožnosti

Vhodným způsobem senzibilizovaným morčatům-albínům o hmotnosti nejméně 250 g se intradermálně vstříknou na několik míst odstupňované dávky zkoušeného přípravku. V místě podání se za 24 h až 28 h objeví reakce ve tvaru edematózních otoků se zarudnutím a případně s nekrózou. Velikost a závažnost reakce se mění podle dávky. U nesenzibilizovaných morčat podobné injekce nevyvolají žádnou reakci.

Zkouška čistoty

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 7,5.

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 5 g/l, pokud se použil při přípravě.

Senzibilizace. Použijí se tři morčata, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. V pětidenních intervalech se třikrát intradermálně vstříkne po asi 500 m.j. zkoušeného přípravku v objemu 0,1 ml. Za 15 dnů až 21 dnů po třetím podání se intradermálně vstříkne stejná dávka stejným morčatům a kontrolní skupině tří morčat stejné hmotnosti, kterým tuberkulin nebyl dříve podán. Za 24 h až 28 h nejsou reakce u těchto 2 skupin zvířat významně odlišné.

Toxicita. 0,5 ml se subkutánně vstříkne dvěma zdravým morčatům o hmotnosti nejméně 250 g, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. Zvířata se pozorují 7 dnů; není vyvolán žádný nežádoucí účinek.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním reakcí vyvolaných intradermálním podáním stoupajících dávek zkoušeného přípravku senzibilizovaným morčatům s reakcemi vyvolanými podáním známých koncentrací vhodného referenčního přípravku derivátu purifikovaného proteinu aviárního stejného původu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Nejméně devět morčat-albínů o živé hmotnosti 400 g až 600 g je senzibilizováno hluboko intramuskulárně podáním vhodné dávky inaktivovaného nebo živého kmene *M. avium*. Nejdříve 4 týdny po senzibilizaci se morčata vyholí na obou bocích těla tak, aby se na každé straně získalo místo pro nejvýše čtyři injekce. Zkoušený a referenční přípravek se ředí tlumivým izotonickým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným (pH 6,5 až 7,5), který obsahuje *polysorbát 80 R* v koncentraci 0,005 g/l. Použijí se nejméně tři dávky referenčního a tři dávky zkoušeného přípravku. Dávky se zvolí tak, aby průměr lézí jimi vyvolaných byl nejméně 8 mm a nejvýše 25 mm. Ředění se podávají náhodně podle zásad latinského čtverce. Každá dávka se vstříkne intradermálně v konstantním objemu 0,1 ml nebo 0,2 ml. Průměr lézí se měří za 24 h až 28 h a výsledek zkoušky se vypočítá obvyklými statistickými metodami za předpokladu, že průměry lézí jsou přímo úměrné k logaritmu koncentrace tuberkulinů.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) je nejméně 50 % až 200 % nalezené účinnosti. Nalezená účinnost je 75 % až 133 % deklarované účinnosti. Deklarovaná účinnost je nejméně 20 000 m.j. v mililitru.

Uchovávání

Při teplotě (5 ± 3) °C, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v mezinárodních jednotkách v mililitru,
- název a množství každé přidané látky,
- *u lyofilizovaného přípravku*:
  - název a objem rozpouštědla, které se má přidat,
  - že přípravek se použije ihned po rozpuštění.

Tuberculini bovini derivatum proteinosum purificatum

Derivát purifikovaného proteinu bovinního tuberkulinu

Je to přípravek získaný z tepelně ošetřeného produktu kultivace a lýzy *Mycobacterium bovis*, který má schopnost prokázat opožděnou přecitlivělost u zvířat senzibilizovaných proti mikroorganismům stejného druhu.

Výroba

Získává se z frakcí rozpustných ve vodě a připravených zahříváním ve volně proudící páře a následnou filtrací kultur *M. bovis* vyrostlých v tekuté syntetické živné půdě. Účinná frakce filtrátu, kterou tvoří především bílkoviny, se izoluje srážením, promýváním a znovu se rozpouští. Může se přidat protimikrobní konzervační látka, která nevyvolává falešné pozitivní reakce, jako je např. fenol. Konečný sterilní přípravek, prostý mykobakterií, se asepticky rozplní do sterilních skleněných obalů, které se poté uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. Přípravek se může lyofilizovat.

Zkouška totožnosti, zkoušky na čistotu a stanovení účinnosti se provádějí u tekutého přípravku nebo lyofilizovaného přípravku po rozpuštění podle návodu.

Zkouška totožnosti

Vhodným způsobem senzibilizovaným morčatům-albínům o hmotnosti nejméně 250 g se intradermálně vstříknou na několik míst odstupňované dávky zkoušeného přípravku. V místě podání se za 24 h až 28 h objeví reakce ve tvaru edematózních otoků se zarudnutím a případně s nekrózou. Velikost a závažnost reakce se mění podle dávky. U nesenzibilizovaných morčat podobné injekce nevyvolají žádnou reakci.

Zkouška čistoty

Hodnota pH (*2.2.3*). 6,5 až 7,5.

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 5 g/l, pokud se použil při přípravě.

Senzibilizace. Použijí se tři morčata, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. V pětidenních intervalech se třikrát intradermálně vstříkne asi 500 m.j. zkoušeného přípravku v objemu 0,1 ml. Za 15 dnů až 21 dnů po třetím podání se intradermálně vstříkne stejná

dávka stejným morčatům a kontrolní skupině tří morčat stejné hmotnosti, kterým tuberkulin nebyl dříve podán. Za 24 h až 28 h nejsou reakce u těchto 2 skupin zvířat významně odlišné.

Toxicita. 0,5 ml se subkutánně vstříkne dvěma zdravým morčatům o hmotnosti nejméně 250 g, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. Zvířata se pozorují 7 dnů; není vyvolán žádný nežádoucí účinek.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním reakcí vyvolaných intradermálním podáním stoupajících dávek zkoušeného přípravku senzibilizovaným morčatům s reakcemi vyvolanými známými koncentracemi *derivátu purifikovaného proteinu bovinního tuberkulinu BRP* nebo referenčního přípravku, který je kalibrován v jednotkách Evropského lékopisu.

Nejméně 9 morčat-albínů o živé hmotnosti 400 g až 600 g je senzibilizováno hluboko intramuskulárně dávkou 0,0001 mg vlhké masy živého *M. bovis* - kmen AN5 resuspendované v 0,5 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Nejdříve 4 týdny po senzibilizaci se morčata vyholí na obou bocích těla tak, aby se na každé straně získalo místo pro nejvýše čtyři injekce. Zkoušený a referenční přípravek se ředí tlumivým izotonickým roztokem fosforečnanovým s chloridem sodným (pH 6,5 až 7,5), který obsahuje *polysorbát 80 R* v koncentraci 0,005 g/l. Použijí se nejméně tři dávky referenčního a tři dávky zkoušeného přípravku. Dávky se zvolí tak, aby průměr lézí jimi vyvolaných byl nejméně 8 mm a nejvýše 25 mm. Ředění se podávají náhodně podle zásad latinského čtverce. Každá dávka se vstříkne intradermálně v konstantním objemu 0,1 ml nebo 0,2 ml. Průměr lézí se měří za 24 h až 28 h a výsledek zkoušky se vypočítá obvyklými statistickými metodami za předpokladu, že průměry lézí jsou přímo úměrné k logaritmu koncentrace tuberkulinů.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0,95$) je nejméně 50 % až 200 % nalezené účinnosti. Nalezená účinnost je 66 % až 150 % deklarované účinnosti. Deklarovaná účinnost je nejméně 20 000 Ph.Eur. jednotek v mililitru.

Uchovávání

Při teplotě (5 ± 3) °C, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- účinnost v Ph.Eur. jednotkách v mililitru,
- název a množství každé přidané látky,
- *u lyofilizovaného přípravku*:
  - název a objem rozpouštědla, které se má přidat,
  - že přípravek se použije ihned po rozpuštění.

Tuberculini derivatum proteinosum purificatum ad usum humanum

Derivát purifikovaného proteinu tuberkulinu pro humánní použití

Je to přípravek získaný ze zahřátého produktu kultivace a lýzy jednoho nebo více kmenů *Mycobacterium tuberculosis*, který má schopnost prokázat opožděnou přecitlivělost u zvířat senzibilizovaných proti mikroorganismům stejného druhu.

Výroba

Připravuje se z frakcí rozpustných ve vodě získaných tepelným zpracováním v proudící páře nebo autoklávu z kultur mykobakterií v tekuté syntetické živné půdě. Dále se filtruje. Účinná frakce filtrátu, kterou tvoří především bílkoviny, se izoluje srážením a promýváním a znovu se rozpouští. Přípravek neobsahuje mykobakteria. Může se přidat protimikrobní konzervační látka, která nevyvolává falešně pozitivní reakce, jako je např. fenol v koncentraci 5 g/l, a vhodný stabilizátor, který zabrání adsorpci na povrch ze skla nebo plastu. Konečný sterilní přípravek se asepticky rozplní do sterilních skleněných obalů, které se poté uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. Přípravek je bezbarvá nebo světle žlutá tekutina. Zředěný přípravek se může lyofilizovat. Do přípravků, které mají být lyofilizovány, se fenol nepřidává.

Koncentrovaná forma zkoušeného přípravku vyhovuje zkoušce totožnosti, zkouškám na čistotu a požadavku na účinnost uvedeným dále; zředěný přípravek vyhovuje zkoušce totožnosti, zkouškám na hodnotu pH, na obsah fenolu a na sterilitu a požadavku na účinnost uvedeným dále.

Zkoušky totožnosti

Zdravým bílým nebo světle zbarveným morčatům specificky senzibilizovaným se intradermálně vstříknou odstupňované dávky zkoušeného přípravku. V místě podání vznikne reakce přecházející z erytému až do nekrózy. U nesenzibilizovaných morčat podobné injekce nevyvolají žádnou reakci.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). Hodnota pH tekuté formy a lyofilizované formy po rozpuštění podle návodu je 6,5 až 7,5.

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 5 g/l, pokud se použil při přípravě.

Živé mykobakterie. Dvěma morčatům o hmotnosti 300 g až 400 g se intraperitoneálně nebo subkutánně vstříkne 5,0 ml. Zvířata se pozorují nejméně 42 dnů, potom se usmrtí a pitvají. Žádné ze zvířat nemá známky infekce mykobakteriemi.

Na vhodných živných půdách se provede zkouška na přítomnost živých mykobakterií ve zkoušeném přípravku. Výsledek zkoušky je negativní.

Senzibilizace. Použijí se tři morčata, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. V pětidenních intervalech se třikrát intradermálně vstříkne asi 500 m.j. zkoušeného přípravku v objemu 0,1 ml. Za dva až tři týdny po třetím podání se intradermálně vstříkne stejná dávka stejným morčatům a kontrolní skupině tří morčat stejné hmotnosti, kterým tuberkulin nebyl dříve podán. Za 48 h až 72 h nejsou reakce u těchto dvou skupin zvířat výrazně odlišné.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Toxicita. 50 000 m.j. se subkutánně vstříkne dvěma zdravým morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. Zvířata se pozorují 7 dnů; není vyvolán žádný nežádoucí účinek.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním reakcí vyvolaných intradermálním podáním stoupajících dávek zkoušeného přípravku senzibilizovaným morčatům s reakcemi vyvolanými podáním známých koncentrací vhodného referenčního přípravku derivátu purifikovaného proteinu tuberkulinu stejného původu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, jejichž účinnost u člověka je klinicky prokázána.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

V minerálním oleji s emulgátorem nebo bez něho se připraví suspenze, která v mililitru obsahuje 0,1 mg teplem inaktivovaných, vysušených mykobakterií kmene stejného typu jako ve zkoušeném přípravku. Senzibilizuje se nejméně šest světle zbarvených morčat vážících nejméně 400 g intramuskulárním nebo intradermálním podáním celkově asi 0,5 ml suspenze rozdělené, pokud je to nutné, i do několika míst. Zkouška se provádí nejdříve za jeden měsíc a nejdéle za šest měsíců po senzibilizaci. Depilují se boky morčat tak, aby se mohly podat nejméně tři injekce na každou stranu, ale nejvýše dvanáct injekcí jednomu zvířeti. Připraví se ředění zkoušeného přípravku a referenčního přípravku v tlumivém izotonickém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným (pH 6,5 až 7,5), který obsahuje 0,05 g/l *polysorbátu 80*. Jestliže zkoušený přípravek je lyofilizovaný a neobsahuje stabilizátor, rozpustí se ve výše uvedeném tlumivém roztoku. Použijí se nejméně tři dávky referenčního přípravku a nejméně tři dávky zkoušeného přípravku. Nejvyšší dávka u obou přípravků je asi desetinásobkem nejnižší dávky. Vyberou se takové dávky, aby reakce po podání měly průměr nejméně 8 mm a nejvýše 25 mm. U jakékoliv zkoušky se pořadí podávaných koncentrací vybírá náhodně podle latinského čtverce. Každá dávka se vstříkne intradermálně v konstantním objemu 0,1 ml nebo 0,2 ml. Průměr lézí se měří za 24 h až 48 h a výsledek zkoušky se počítá obvyklými statistickými metodami za předpokladu, že průměry lézí jsou přímo úměrné logaritmu koncentrace zkoušeného přípravku.

Stanovená hodnota účinnosti je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) je nejméně 64 % a nejvýše 156 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Při teplotě (5 ± 3) °C, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v mililitru,
- typ mykobakteria použitého při přípravě přípravku,
- název a množství protimikrobních konzervačních látek a jiných látek přidaných k přípravku,
- u lyofilizovaných přípravků údaj, že se přípravek rozpustí v roztoku, který dodává výrobce.

Jestliže balení neobsahuje příbalový leták s upozorněním, že inhalace koncentrovaného derivátu purifikovaného proteinu tuberkulinu může vyvolat toxickou reakci, je toto upozornění uvedeno v označení na obalu společně s údajem o opatrnosti při zacházení s lyofilizátem.

Výstraha: Derivát purifikovaného proteinu tuberkulinu se nepodává neředěný.

Tuberculinum pristinum ad usum humanum

Starý tuberkulin pro humánní užití

Synonyma. Kochův starý tuberkulin, Tuberculinum Koch vetus

Je to zahřátím koncentrovaný filtrát obsahující rozpustné produkty kultury a lýzy jednoho nebo více kmenů mykobakterií.

Výroba

Připravuje se z kultur vyrostlých v tekuté živné půdě, kterou může být bujon s glycerolem nebo syntetická živná půda. Růst kultury je rychlý a hojný. Kultury se inaktivují v autoklávu nebo proudící parou nejméně 1 h při 100 °C. Tekutá kultura, ze které mikroorganismy mohou být odstraněny filtrací nebo nemusí, se koncentruje odpařením obvykle na 1/10 původního objemu, dále se přidává fenol v koncentraci 5 g/l nebo jiná vhodná protimikrobní konzervační látka, která nevyvolá falešně pozitivní reakce. Přípravek se filtruje, kvantitativně analyzuje a ředí. Konečný sterilní přípravek se asepticky rozplní do sterilních skleněných obalů, které jsou poté uzavřeny tak, aby se předešlo kontaminaci. Neobsahuje mykobakteria. Přípravek je čirá, viskózní, žlutá až hnědá tekutina.

Koncentrovaná forma zkoušeného přípravku vyhovuje zkoušce totožnosti, zkouškám na čistotu a požadavku na účinnost uvedeným dále; zředěný přípravek vyhovuje zkoušce totožnosti, zkouškám na obsah fenolu a na sterilitu a požadavku na účinnost, které jsou uvedeny dále.

Zkouška totožnosti

Zdravým bílým nebo světle zbarveným morčatům specificky senzibilizovaným se intradermálně vstříknou odstupňované dávky zkoušeného přípravku. V místě podání vznikne reakce přecházející z erytému až do nekrózy. U nesenzibilizovaných morčat podobné injekce nevyvolají žádnou reakci.

Zkoušky na čistotu

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 5 g/l, pokud byl použit při přípravě.

Živá mykobakteria. Třem morčatům o hmotnosti 300 g až 400 g se intraperitoneálně nebo subkutánně vstříkne 1,0 ml. Zvířata se pozorují nejméně 42 dnů, potom se usmrtí a pitvají. Žádné ze zvířat nemá známky infekce mykobakteriemi.

Na vhodných živných půdách se provede zkouška na přítomnost živých mykobakterií ve zkoušeném přípravku. Výsledek zkoušky je negativní.

Senzibilizace. Použijí se tři morčata, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. V pětidenních intervalech se třikrát intradermálně vstříkne asi 500 m.j. zkoušeného přípravku v objemu 0,1 ml. Za dva až tři týdny po třetím podání se intradermálně vstříkne stejná dávka stejným morčatům a kontrolní skupině tří morčat stejné hmotnosti, kterým tuberkulin nebyl dříve podán. Za 48 h až 72 h nejsou reakce u těchto 2 skupin zvířat výrazně odlišné.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Toxicita. 0,5 ml se subkutánně vstříkne dvěma zdravým morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, která nebyla podrobena žádnému léčení, jež by mohlo ovlivnit tuto zkoušku. Zvířata se pozorují 7 dnů; není vyvolán žádný nežádoucí účinek.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním reakcí vyvolaných intradermálním podáním stoupajících dávek zkoušeného přípravku senzibilizovaným morčatům s reakcemi vyvolanými podáním známých koncentrací vhodného referenčního přípravku starého tuberkulinu stejného původu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, jejichž účinnost u člověka je klinicky prokázána.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

V minerálním oleji s emulgátorem nebo bez něho se připraví suspenze, která v mililitru obsahuje 0,1 mg teplem inaktivovaných, vysušených mykobakterií kmene stejného typu jako ve zkoušeném přípravku. Senzibilizuje se nejméně šest světle zbarvených morčat vážících nejméně 400 g intramuskulárním nebo intradermálním podáním celkově asi 0,5 ml suspenze rozdělené, pokud je to nutné, i do několika míst. Zkouška se provádí nejdříve za jeden měsíc a nejdéle za šest měsíců po senzibilizaci. Depilují se boky morčat tak, aby se mohly podat nejméně tři injekce na každou stranu, ale nejvýše dvanáct injekcí jednomu zvířeti. Použijí se nejméně tři dávky referenčního přípravku a nejméně tři dávky zkoušeného přípravku. Nejvyšší dávka u obou přípravků je asi desetinásobkem nejnižší dávky. Vyberou se takové dávky, aby reakce po podání měly průměr nejméně 8 mm a nejvýše 25 mm. U jakékoliv zkoušky se pořadí podávaných koncentrací vybírá náhodně podle latinského čtverce. Každá dávka se vstříkne intradermálně v konstantním objemu 0,1 ml nebo 0,2 ml. Průměr lézí se měří za 24 h až 48 h a výsledek zkoušky se počítá obvyklými statistickými metodami za předpokladu, že průměry lézí jsou přímo úměrné logaritmu koncentrace zkoušeného přípravku.

Stanovená hodnota účinnosti je 80 % až 125 % deklarované účinnosti. Interval spolehlivosti (P = 0,95) je nejméně 64 % a nejvýše 156 % deklarované účinnosti.

Uchovávání

Při teplotě (5 ± 3) °C, chráněn před světlem.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- počet mezinárodních jednotek v mililitru,
- typ mykobakteria použitého při přípravě přípravku,
- název a množství protimikrobních konzervačních látek a jiných látek přidaných k přípravku.

Výstraha: Starý tuberkulin nesmí být vstříknut v koncentrované formě, ale zředěný tak, aby se podala 1 m.j. až 100 m.j. v jedné dávce.

Vaccinum anthracis vivum ad usum veterinarium

Živá vakcína proti sněti slezinné pro veterinární použití

Je to suspenze živých spor oslabeného neopouzdřeného kmene *Bacillus anthracis*.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Použitý kmen buď není letální ani pro morčata ani pro myši, nebo je letální pro morčata, ale není letální pro králíky, nebo je letální jen pro některé králíky.

B. anthracis se kultivuje ve vhodné živné půdě. Na konci růstu se spory suspendují ve stabilizačním roztoku a spočítají se. Do přípravku se může přidávat adjuvans.

Zkoušky totožnosti

B. anthracis přítomný ve zkoušeném přípravku se identifikuje morfologicky, sérologicky, kultivačně a biochemickými zkouškami.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Zkouška se provádí na jednom z druhů zvířat, pro který je zkoušený přípravek určen. Pokud je určen pro několik druhů zvířat, včetně koz, provede se zkouška na kozách. Dvěma vnímavým zvířatům se subkutánně nebo intradermálně vstříkne dvojnásobek dávky uvedené pro použitý druh v označení a zvířata se pozorují 14 dní. Neprojeví se výrazná systémová reakce, ale v místě podání se může objevit lokální reakce. Závažnost lokální reakce se různí podle kmene spor a adjuvancia použitého ve zkoušeném přípravku, ale neprojeví se nekróza.

Počet spor. Počet živých spor stanovený kultivací na pevných půdách je nejméně 80 % počtu uvedeného v označení.

Bakterie a houby. Provede se mikroskopické vyšetření a vyočkování na vhodné živné půdy. Zkoušený přípravek neobsahuje kontaminující bakterie ani houby.

Stanovení účinnosti

Jestliže kmen *B. anthracis* není letální pro morčata ani pro myši, může se stanovení provést na morčatech. U kmene, který je letální pro morčata, ale ne pro králíky, se stanovení může provést na králících. U kmene, který je letální pro některé králíky, se stanovení provede na ovcích.

Provádí-li se stanovení na morčatech nebo králících, použije se deset zdravých zvířat (skupina a). Každému zvířeti se subkutánně nebo intradermálně vstříkne l/10 nejnižší dávky vakcíny uvedené v označení pro ovce. Zvířata se pozorují 21 dní. Pokud uhyne z nespecifických příčin větší počet než dvě zvířata, stanovení se opakuje. Jako kontrola se použijí tři zvířata stejného druhu i původu.

Provádí-li se stanovení na ovcích, použije se pět zdravých zvířat (skupina b). Každému zvířeti se subkutánně nebo intradermálně vstříkne 1/10 nejnižší dávky vakcíny uvedené v označení pro ovce. Zvířata se pozorují 21 dní. Jako kontrola se použijí tři ovce stejného původu. Každému zvířeti z vakcinované skupiny (a) či (b) se vstříkne subkutánně nejméně 100 MLD, kontrolním zvířatům 10 MLD kmene *B. anthracis*, který je patogenní pro druh zvířat použitých ke stanovení. Zvířata se pozorují 10 dní, během nichž všechna vakcinovaná zvířata přežijí a všechna kontrolní zvířata

uhynou na sněť slezinnou. Uhynou-li vakcinovaná zvířata po čelenži, stanovení se opakuje. Pokud vakcinovaná zvířata uhynou i při opakované zkoušce, zkoušený přípravek nevyhovuje.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede:

- kmen použitý k výrobě,
- počet živých spor v mililitru.

Vaccinum aphtharum epizooticarum inactivatum ad ruminantes

Inaktivovaná vakcína proti slintavce a kulhavce pro přežvýkavce

Je to tekutý přípravek obsahující jeden nebo více typů nebo subtypů slintavkových virů inaktivovaných bez poškození jejich imunogenity.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Virus se pomnoží buď v epitelové suspenzi z hovězích jazyků, získaných bezprostředně po porážce zdravých zvířat, nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Virus se oddělí z buněčného materiálu filtrací nebo jinou vhodnou metodou a za vhodných podmínek se inaktivuje.

Z inaktivovaného antigenu se připraví vakcína smícháním s jedním nebo s více adjuvancii. Antigen může být koncentrován a purifikován různými způsoby. Koncentrovaný antigen se používá k výrobě vakcíny buď bezprostředně, nebo po uchovávání při teplotě nepřesahující -90 °C, pokud nebyla prokázána stabilita antigenu při vyšší teplotě.

Validace procesu inaktivace. V průběhu inaktivace se titr viru monitoruje citlivou a reprodukovatelnou metodou. Postup inaktivace je vhodný, pokud logaritmicky vyjádřený pokles titru viru je lineární a extrapolace prokazuje, že na konci inaktivace je počet infekčních virových částic v 10 000 litrech tekutého přípravku menší než jedna.

Várka inaktivovaného antigenu

Inaktivace. Poměrná část každé šarže zásobní várky inaktivovaného antigenu, představující nejméně 200 dávek, se zkouší na nepřítomnost infekčního viru inokulací do citlivých buněčných kultur. Aby se umožnilo zkoušení tak velkých vzorků v buněčných kulturách, je vzorek inaktivovaného antigenu pro tento účel koncentrován. Prokáže se však, že zvolená koncentrace a metoda zkoušky neruší detekci infekčního viru ve zkoušeném vzorku a že koncentrovaný inaktivovaný antigen nebrání pomnožení viru, ani není příčinou toxických změn.

Antigenita. Obsah antigenu v každé várce inaktivovaného antigenu se stanoví metodou in vitro (na příklad: měření 146S-částic na základě odstřeďování v gradientu sacharosy a spektrofotometrického stanovení v ultrafialové oblasti při 251 nm).

Bezpečnost. Pro zkoušku bezpečnosti u skotu, jak je popsána níže, může být reprezentativní vzorek várky inaktivovaného antigenu ředěn a smíchán s adjuvans.

Sterilita. Várka inaktivovaného antigenu, adjuvans a všechny ředicí tlumivé roztoky vyhovují zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Účinnost. Reprezentativní vzorek várky inaktivovaného antigemu se může pro zkoušku účinnosti na skotu ředit a smíchat s adjuvans, jak je uvedeno níže.

V případě krajní naléhavosti a za souhlasu oprávněné autority může být šarže vakcíny uvolněna před ukončením zkoušek na čistotu a stanovením účinnosti za předpokladu, že byla provedena zkouška na sterilitu u zásobní várky inaktivovaného antigenu a u všech dalších složek vakcíny a že zkouška bezpečnosti a stanovení účinnosti byly provedeny u reprezentativní šarže vakcíny připravené z téže várky inaktivovaného antigenu. V této souvislosti není šarže považována za reprezentativní, pokud nebyla připravena ze stejného množství antigenu a ve stejném složení jako šarže, která se má uvolnit.

Zkouška totožnosti

Sérum vnímavého zvířete, které bylo imunizováno vakcínou, zkoušené přiměřeně citlivou metodou neutralizuje typy nebo subtypy virů použitých k výrobě zkoušeného přípravku.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se tři kusy nevakcinovaného skotu, nejméně šest měsíců starého, jejichž sérum je prosté protilátek proti slintavce a kulhavce a které pocházejí z oblasti prosté onemocnění slintavkou a kulhavkou. Každému zvířeti se intradermálně vstříkne do jazyka, nejméně na dvacet míst, po 0,1 ml zkoušené vakcíny do každého místa. Zvířata se pozorují nejméně 4 dny. U zvířat se neobjeví léze ani příznaky onemocnění slintavkou a kulhavkou. Na konci pozorovací doby se těmto zvířatům vstříkne předepsaným způsobem trojnásobná dávka vakcíny uvedená v označení na obale. Potom se zvířata pozorují dalších 6 dnů. U zvířat se neobjeví žádné léze ani klinické příznaky onemocnění slintavkou a kulhavkou na paznehtech nebo na jazyku a také reakce v místě podání vakcíny je bezvýznamná.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Účinnost se vyjádřuje jako počet 50% ochranných dávek pro skot (PD_{50}) obsažených v 1 dávce vakcíny uvedené v označení. PD_{50} se stanoví za podmínek níže uvedených na zvířatech po primární vakcinaci a následné čelenži 10 000 ID_{50} virulentního bovinního viru stejného typu nebo subtypu jako ten, který byl použit pro výrobu zkoušeného přípravku.

Jedna dávka vakcíny pro skot obsahuje minimálně 3 PD_{50}.

Zkouška účinnosti se provádí pro každý typ a subtyp viru slintavky a kulhavky obsažený ve vakcíně.

Použije se skot ve stáří nejméně 6 měsíců pocházející z oblasti prosté onemocnění slintavkou a kulhavkou, který nebyl nikdy vakcinován proti slintavce a kulhavce a je bez protilátek neutralizujících různé typy viru slintavky a kulhavky. Vakcinují se nejméně tři skupiny po nejméně 5 kusech

skotu ve skupině způsobem uvedeným v označení na obale. Pro každou skupinu se použije jiná dávka vakcíny. Různé dávky vakcíny se podávají spíše vstříknutím různých objemů vakcíny než různých ředění vakcíny. Na příklad, jestliže se v označení uvádí, že podání 2 ml odpovídá jedné dávce vakcíny, pak by se čtvrtina dávky vakcíny dosáhla podání 0,5 ml přípravku a desetina dávky podáním 0,2 ml přípravku. Za tři týdny po vakcinaci se provede čelenž vakcinovaných zvířat včetně dvou nevakcinovaných kontrolních zvířat suspenzí viru získaného od skotu, která je plně virulentní, a stejného typu nebo subtypu jako virus, který byl použit pro výrobu vakcíny. K infekci se použije 10 000 ID_{50} vstříknutých intradermálně na dvě místa (vždy po 0,1 ml) na horní plochu jazyka. Zvířata se pozorují 8 dní a potom se porazí. Nechráněná zvířata mají léze na jiných místech než na jazyku, chráněná zvířata mohou mít léze na jazyku. Zkoušku lze hodnotit jedině tehdy, jestliže každé kontrolní zvíře má léze nejméně na třech končetinách. Z počtu chráněných zvířat v každé skupině se vypočítá množství PD_{50} obsažených v jedné dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Vakcína se ochrání před zmrznutím.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede:

- metoda přípravy,
- typy a subtypy virů, použitých k přípravě vakcíny.

Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti ptačí infekční bronchitidě

Je to emulze nebo suspenze jednoho nebo více sérotypů viru infekční ptačí bronchitidy, který byl inaktivován takovým způsobem, že je zachována imunogenní účinnost. Tento článek popisuje vakcíny určené k ochraně proti poklesu snášky nebo kvality vajec. U vakcín určených také k ochraně proti respiratorním příznakům se kromě uvedené zkoušky účinnosti požaduje též provedení dodatečné zkoušky prokazující tento účinek.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Virus je pomnožován v kuřecích embryích pocházejících ze zdravých chovů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*).

Pro zjištění reziduálního živého viru ptačí infekční bronchitidy se provádí pomnožovací zkouška u každé šarže antigenu bezprostředně po inaktivaci a u konečné várky vakcíny nebo, jestliže vakcína obsahuje adjuvans, u nerozplněné várky antigenu nebo směsi nerozplněných antigenů bezprostředně před přidáním adjuvans; zkouška se provádí na kuřecích embryích z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo na vhodných buněčných kulturách. Použité množství inaktivovaného viru odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Nezjistí se živý virus.

Vakcína může obsahovat jedno nebo více vhodných adjuvans.

Výběr složení vakcíny

Vakcína vyhovuje ve zkoušce bezpečnosti a imunogenity pro každou kategorii zvířat, pro niž je určena. Následující zkouška může být použita k prokázání účinnosti (*5.2.7*).

Imunogenita. Zkouška popisovaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k důkazu imunogenity.

Zkouška účinnosti šarže

Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti se neprovádí rutinně u každé šarže. Pro danou vakcínu se provádí jednou nebo vícekrát podle rozhodnutí nebo souhlasu oprávněné autority. Není-li zkouška prováděna, je provedena vhodná validovaná zkouška pro porovnání se šarží, která zkoušce Stanovení účinnosti vyhověla. Následující zkouška se může použít, když byla dostatečně statisticky zhodnocena její korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Jedna očkovací dávka se intramuskulárně vstříkne každému z deseti kuřat pocházejícímu z chovu prostého specifikovaných patogenů ve věku mezi dvěma týdny a nejnižším stářím stanoveným pro očkování. Pět kuřat ze stejného líhnutí slouží jako neočkovaná kontrola. Vzorky séra od každého kuřete se odeberou těsně před podáním zkoušené vakcíny a po období vymezeném zkoušením porovnávací vakcíny. Vhodnou sérologickou metodou, např. neutralizací séra, se v každém séru stanoví titr protilátek pro každý sérotyp obsažený ve vakcíně. Hladina protilátek není významně nižší než hladina, která byla získána u šarže dávající vyhovující výsledek ve zkoušce popsané ve stati Stanovení účinnosti (referenční vakcína). Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže séra odebraná od neočkovaných kontrol a od kuřat před podáním vakcíny neobsahují zjistitelné specifické protilátky.

Zkoušky totožnosti

U vnímavých zvířat vyvolává vakcína tvorbu specifických protilátek proti každému sérotypu viru obsaženému ve vakcíně prokazatelných neutralizační zkouškou.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvojitá očkovací dávka se vstříkne doporučeným způsobem každému z deseti 14 až 28 dnů starých kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Kuřata se sledují 21 dnů. Neprojeví se abnormální místní nebo celková reakce.

Inaktivace.

A. U vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na kuřecí embrya se vstříknou dvě pětiny dávky do alantoidní dutiny deseti 9 až 11 dnů starých kuřecích embryí z chovu prostého specifikovaných patogenů a inkubují se. Sledují se 5 až 6 dnů, odděleně se připraví směsné vzorky alantoidních tekutin z živých embryí a z vajec obsahujících uhynulá embrya, kromě těch, která uhynula v průběhu prvních 24 h po injekci. Všechna embrya uhynulá po 24 h a ta, která přežívají 5 až 6 dnů po injekci, se vyšetří na přítomnost abnormalit. Nezjistí se úhyny ani abnormality přisuzovatelné vakcinačnímu viru.

Do alantoidní dutiny každého z deseti 9 až 11 dnů starých SPF kuřecích embryí se vstříkne 0,2 ml směsné alantoidní tekutiny z živých embryí a do deseti obdobných kuřecích embryí 0,2 ml směsné tekutiny z uhynulých embryí a inkubují se 5 až 6 dnů. Všechna embrya uhynulá po 24 h a ta, která přežívají 5 až 6 dnů po injekci, se vyšetří na přítomnost abnormalit. Nezjistí se úhyny ani abnormality přisuzovatelné vakcinačnímu viru.

Jestliže v jedné z etap uhyne více než 20 % embryí, zkouška se od této etapy opakuje.

Zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se nevyskytne úhyn nebo abnormality přisuzovatelné vakcinačnímu viru.

B. U vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na buněčné kultury se inokuluje deset dávek na vhodné buněčné kultury. Pokud vakcína obsahuje olejové adjuvans, odstraní se vhodným způsobem. Inkubuje se 7 dnů při (38 ± 1) °C. Provádí se pasáž na další sadu buněčných kultur a inkubuje se 7 dnů při (38 ± 1) °C. Žádná z kultur nevykazuje příznaky infekce.

Cizí agens. Provádí se na kuřatech ze zkoušky bezpečnosti. Každému kuřeti se za 21 dnů po injekci dvojité dávky vakcíny vstříkne stejným způsobem jedna dávka. Po dvou týdnech se odeberou vzorky séra od každého kuřete a provedou se zkoušky na protilátky proti následujícím agens metodami předepsanými pro drůbeží chovy prosté specifikovaných patogenů, které jsou určeny pro výrobu a kontrolu kvality vakcín (*5.2.2*): virus ptačí encefalomyelitidy, viry ptačí leukózy, hemaglutinující ptačí adenovirus, virus infekční burzitidy, virus infekční laryngotracheitidy, virus influenzy A, virus Markovy choroby, virus newcastleské choroby. Vakcína nevyvolává tvorbu protilátek proti těmto agens.

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Zkouška účinnosti se provádí pro každý sérotyp použitý ve vakcíně. Použijí se čtyři skupiny nejméně po třiceti kuřatech z chovu prostého specifikovaných patogenů a ošetří se následovně:
- skupina A: neočkovaná kontrola,
- skupina B: očkovaná inaktivovanou vakcínou proti ptačí bronchitidě,
- skupina C: očkovaná živou vakcínou proti ptačí infekční bronchitidě a inaktivovanou vakcínou proti ptačí infekční bronchitidě podle doporučovaného schématu,
- skupina D: očkovaná živou vakcínou proti ptačí infekční bronchitidě.

U všech kuřic se zaznamenává snáška a kvalita vajec od počátku snášky až do nejméně čtyř týdnů po infekční zátěži. Na vrcholu snášky se infikují všechny skupiny takovým množstvím virulentního viru ptačí infekční bronchitidy, které je schopno způsobit pokles snášky nebo kvality vajec po tři po sobě jdoucí týdny v průběhu čtyř týdnů po čelenži. Zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže je snáška a kvalita vajec významně lepší u skupiny C než u skupiny D a významně lepší u skupiny B než u skupiny A. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, pokud není pokles snášky ve skupině A, porovnávaný s normální úrovní před čelenží, nejméně 35%, v případě, že se infekční zátěž provádí kmenem Massachusetts. Jestliže je nezbytné provést čelenž jiným sérotypem, u něhož je doloženo, že nezpůsobuje 35% pokles snášky, musí čelenž vyvolat pokles snášky úměrný tomu, který je doložen, v jakémkoliv případě však nejméně 15%.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*

V označení na obalu se uvede:
- pro kterou kategorii a stáří kuřat je vakcína určena,
- návod k použití,
- kmeny a sérotypy virů použitých pro přípravu vakcíny a sérotypy, proti kterým má vakcína chránit,
- zda je kmen ve vakcíně adaptován na embrya nebo na buněčné kultury.

Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti ptačí infekční bronchitidě lyofilizovaná

Je to přípravek z jednoho nebo z více oslabených kmenů viru ptačí infekční bronchitidy.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Každý kmen viru se pomnoží buďto v alantoidní dutině kuřecích embryí z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*), nebo ve vhodné buněčné kultuře (*5.2.4*). Jsou-li buněčné kultury ptačího původu, získají se z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Virové suspenze se sklidí, smíchají se s vhodnou stabilizující tekutinou a lyofilizují.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu může být použit pouze takový kmen viru, který je prokazatelně uspokojivě imunogenní. Následující zkoušky se mohou použít k průkazu účinnosti (*5.2.7*).

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k průkazu imunogenity.

Zkoušení šarže

Pokud byly zkoušky na viry ptačí leukózy a na cizí viry na buněčných kulturách a na kuřecích embryích provedeny s uspokojivými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, mohou být tyto zkoušky při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěny, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s uspokojivým výsledkem na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, jestliže k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Rekonstituovaná vakcína se smíchá s monospecifickým sérem proti použitému kmenu viru nebo s monospecifickými séry proti každému z kmenů ve vakcíně. Takto upravený přípravek již neinfikuje vnímavá devítidenní až jedenáctidenní kuřecí embrya nebo vnímavé buněčné kultury, do nichž je inokulován.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) se použije nejméně deset kuřat v nejnižším stáří uvedeném v označení. Každému kuřeti se nakape do oka deset dávek vakcíny rozpuštěné tak, aby se získala koncentrace vhodná pro zkoušku. Kuřata se pozorují 21 dní. Pro přípravky určené k vakcinaci kuřat starých dva nebo více týdnů se použijí kuřata naočkovaná ve zkoušce na cizí antigeny na kuřatech. Jestliže v době pozorování uhynou více než dvě kuřata z příčin, které nelze připsat vakcíně, zkouška se opakuje. Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže žádné z kuřat nemá vážné klinické příznaky, zvláště příznaky respirační, a jestliže žádné z kuřat neuhyne z příčin, které je možné připsat zkoušenému přípravku.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na viry ptačí leukózy.

Důkaz cizích virů zkouškou na buněčných kulturách (*2.6.5*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry provedené na buněčných kulturách.

Důkaz cizích virů zkouškou na kuřecích embryích (*2.6.3*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry provedené na kuřecích embryích.

Důkaz cizích antigenů zkouškou na kuřatech (*2.6.6*). Vyhovuje zkoušce na cizí antigeny provedené na kuřatech.

Bakterie a houby. Provede se kvantitativní stanovení na bakteriální a houbové kontaminace. Zkoušený přípravek obsahuje nejvýše jeden saprofytický mikroorganismus na dávku a je prostý patogenních mikroorganismů. Přípravky určené pro parenterální použití a tekutiny dodávané s nimi vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Zkouška na mykoplazmata (*2.6.7*). Vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Stanoví se na buněčných kulturách nebo inokulací do alantoidní dutiny devíti- až jedenáctidenních kuřecích embryí. Jedna dávka zkoušeného přípravku obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá nejnižšímu deklarovanému titru.

Stanovení účinnosti

Stanovení účinnosti se provede pro každý kmen viru použitý k přípravě vakcíny.

Použijí se vnímavá kuřata z jednoho chovu prostého specifikovaných patogenů a nejnižšího stáří uvedeného pro vakcínu. Každému z nejméně dvaceti kuřat se pro každý z udávaných způsobů podání aplikuje takový objem rozpuštěné vakcíny, který obsahuje množství viru, jež odpovídá nejnižšímu titru uvedenému v označení. Pro kontrolu se použije deset kuřat. Nejméně po 21 dnech se infikuje každé kuře intratracheálně 10^3 EID_{50} virulentního kmene ptačí infekční bronchitidy téhož sérotypu, jako je kmen, pro který se stanovení účinnosti provádí. Mezi čtvrtým a sedmým dnem po infekci se kuřata usmrtí a seškrábe se sliznice průdušnice. Seškrabaná tkáň z každého kuřete se dá samostatně do sterilní zkumavky se 3 ml tryptózové půdy obsahující antibiotikum. Z každé zkumavky se vstříkne 0,2 ml půdy do alantoidní dutiny každému z pěti devíti- až jedenáctidenních kuřecích embryí. Embrya, která uhynou v prvních 24 h, se odstraní jako nespecifické úhyny. Nejméně čtyři z každých pěti embryí musí toto období přežít. Po sedmi dnech se zbývající embrya vyšetří. Jestliže jedno embryo ze skupiny uhynulo nebo vykazuje charakteristické změny, usuzuje se, že je nosičem viru. Výsledek zkoušky se považuje za zcela negativní pouze tehdy, když byly provedeny tři postupné pasáže na kuřecích embryích. Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže může být čelenžní virus reizolován z nejvýše 20 % očkovaných a nejméně 80 % kontrolních zvířat.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede stáří, v němž mají být zvířata vakcinována.

Vaccinum brucellosis (Brucella melitensis stirpe rev. 1) vivum cryodesiccatum ad usum veterinarium

Živá vakcína proti brucelóze (Brucella melitensis kmen Rev. 1) lyofilizovaná, pro veterinární použití

Je to lyofilizovaná suspenze živého kmene *Brucella melitensis* Rev. 1; v jedné dávce obsahuje $0,5 \cdot 10^9$ až $4 \cdot 10^9$ živých bakterií.

Výroba

Viz *Vaccina ad usum veterinarium*. *Brucella melitensis* kmen Rev. 1 se kultivuje ve vhodné živné půdě. Metoda kultivace je taková, aby se předešlo bakteriální disociaci, a tak se udržela hladká (S) fáze kultury. Bakterie se suspendují v tlumivém roztoku, který může obsahovat vhodné stabilizátory. Suspenze se plní do obalů a lyofilizuje se.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu vakcíny se smí použít jenom takový kmen, který je prokazatelně vyhovující z hlediska bezpečnosti a imunogenity. Účinnost se může prokázat následující zkouškou (*5.2.7*).

Imunogenita. Z neočkovaného ovčího stáda prostého brucelózy se vybere 40 ovcí (samic), starých 4 až 5 měsíců. Jako čelenžní kmen se použije 24hodinová kultura kmene *Brucella melitensis* H38 v tryptózovém agaru. Ke stanovení infekční dávky se provede předběžná zkouška, ve které se použijí zvířata stejného plemene a věku, jako v hlavní zkoušce. Infekční dávka, která je mezi 10^7 až 10^8 jednotek tvořících kolonie, se vybírá tak, aby způsobila aborty u všech neočkovaných zvířat. Polovina zvířat se očkuje ve 4. až 6. měsíci věku v souladu s doporučeným programem a za použití minimální doporučené dávky. Synchronizuje se říje čtyřiceti zvířat, která se ve věku 10 až 12 měsíců inseminují. Dva až tři měsíce po inseminaci se zjišťuje březost a všechna zvířata, jež nejsou březí, se ze zkoušky vyloučí. Všem březím zvířatům se do spojivkového vaku nakape infekční dávka kmene *Brucella melitensis* H38. Výskyt abortů se zaznamená a jeho původ se ověří zkouškou na přítomnost použitého infekčního kmene u potratů a u bahnic (použijí se selektivní půdy podle Kuzdase a Morse nebo podle Farrella). Zkoušky na přítomnost použitého čelenžního kmene se u každého zvířete provedou v době porodu. Zkoušky na přítomnost použitého kmene v preskapulárních a retromamárních lymfatických uzlinách se provedou při porážce zvířat 4 až 6 týdnů po bahnění. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže se u nejméně 70 % nevakcinovaných zvířat:

- prokáží aborty vyvolané použitým infekčním kmenem,
- prokáže infekce jehňat použitým infekčním kmenem,
- prokáže infekce preskapulárních a retromamárních lymfatických uzlin po porážce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:

- nejvýše u 30 % očkovaných zvířat se zjistí aborty vyvolané použitým čelenžním kmenem,
- použitý čelenžní kmen se prokáže u jehňat nejvýše u 50 % očkovaných zvířat,
- použitý čelenžní kmen se prokáže v době porážky nejvýše u 40 % očkovaných zvířat.

Zkouška totožnosti

Brucella melitensis přítomná ve vakcíně se prokáže vhodnými morfologickými, sérologickými a biochemickými zkouškami a kultivací. Kmen Rev. 1 je inhibován přidáním 3 μg sodné soli benzyl

penicilinu k mililitru vhodné živné půdy; kmen roste na agaru obsahujícím v mililitru 2,5 μg streptomycinu.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma ovcím stáří 4 až 6 měsíců se doporučeným způsobem vstříkne po jedné dávce vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní a nezjistí se žádné významné místní nebo celkové reakce.

Určení disociační fáze. Vhodnou technikou se prověří nejméně 200 kolonií. Vakcinační kmen při kultivaci roste v hladké (S) fázi. Nejméně 95 % kolonií je hladkého typu.

Cizí mikroorganismy. Vakcína rozpuštěná předepsaným způsobem neobsahuje cizí mikroorganismy. Nepřítomnost jiných mikroorganismů než kmen *Brucella melitensis* Rev. 1 se ověří tak, jak je popsáno ve zkoušce na sterilitu, uvedené v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Živé bakterie. Na pevné půdě vhodné pro kultivaci kmene *Brucella melitensis* Rev. 1 se provede stanovení počtu živých bakterií. Vakcína obsahuje $0,5 \cdot 10^9$ až $4 \cdot 10^9$ živých bakterií v jedné dávce.

Doba 50% perzistence. Každé z třiceti dvou myší kmene CD 1 samičího pohlaví ve věku 5 až 6 týdnů se subkutánně vstříkne suspenze vakcíny obsahující 10^8 živých bakterií. Vytvoří se náhodné skupiny po osmi zvířatech a v údobích 3, 6, 9 a 12 týdnů se vždy jedna skupina utratí. Vyjmou se sleziny a individuálně se asepticky homogenizují v deseti objemových dílech *tlumivého roztoku fosforečnanového s chloridem sodným o pH 6,8*. Tato suspenze se naočkuje po 0,4 ml na misky obsahující vhodnou živnou půdu. Na jednu slezinu se použijí nejméně 3 misky (dolní hranice detekce je pět bakterií na slezinu). Současně se provede stejná zkouška s referenčním kmenem, kterým je *Brucella melitensis Rev. 1 BRP*. Pomocí Bonet-Mauryho probitového transformačního postupu (osm myší ve skupině, celkový počet, následná grafická analýza na semilogaritmickém papíru s aritmetickou časovou stupnicí) se vypočítá doba 50% perzistence. Doba 50% perzistence pro vakcinační kmen se významně neliší od doby 50% perzistence referenčního kmene. Pro kmen Rev. 1 bývá obvykle doba 50% perzistence (7,9 ± 1,2) týdne při intervalu spolehlivosti ($P = 0,05$).

Uchovávání

Při teplotě 2 °C až 8 °C.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*

Na štítku obalu se uvede:

- množství bakterií *Brucella melitensis* kmen Rev. 1 v jedné dávce,
- že vakcína je určena pro ovce a kozy staré 4 až 6 měsíců,
- že vakcína může být pro člověka nebezpečná,
- že vakcína se nepodává zvířatům v období březosti a laktace,
- že vakcína může být nebezpečná pro hovězí dobytek, a že proto nemá být chován ve styku s očkovanými zvířaty.

Vaccinum bursitidis infectivae aviariae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti infekční ptačí burzitidě

Je to emulze nebo suspenze vhodného kmene viru infekční ptačí burzitidy typu 1, který byl inaktivován takovým způsobem, že je zachována imunogenní účinnost. Je určena pro chovnou drůbež k ochraně jejího potomstva před infekční ptačí burzitidou.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.* Virus je pomnožován v kuřecích embryích pocházejících ze zdravého chovu, ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*) nebo v kuřatech z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*).

Pro potvrzení inaktivace se provádí pomnožovací zkouška na zbylý živý virus infekční ptačí burzitidy u každé šarže antigenu bezprostředně po inaktivaci a také u nerozplněné konečné várky vakcíny, nebo v případě, že vakcína obsahuje adjuvans u nerozplněného antigenu nebo směsi nerozplněných antigenů bezprostředně před přidáním jakéhokoliv adjuvans; zkouška se provádí na kuřecích embryích nebo na vhodných buněčných kulturách, nebo, jestliže byla pro výrobu vakcíny použita kuřata, na kuřatech z chovu prostého specifikovaných patogenů. Množství inaktivovaného viru použitého ve zkoušce odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Nezjistí se živý virus.

Vakcína může obsahovat jedno nebo více vhodných adjuvans.

Výběr složení vakcíny

U vakcíny se prokazuje, že je dostatečná z hlediska bezpečnosti a imunogenity. K prokázání bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Imunogenita. Každé z nejméně dvaceti kuřic z chovu prostého specifikovaných patogenů a stáří doporučovaného pro očkování (na začátku snášky) se vstříkne nejnižší doporučená dávka vakcíny jedním z doporučovaných způsobů podání. Po 4 až 6 týdnech jsou od každého ptáka odebrány vzorky séra a změří se protilátková odpověď sérum-neutralizační zkouškou (SN). Účinnost se stanoví porovnáním s účinností přípravku, kterým je *sérum proti infekční ptačí burzitidě BRP*, kalibrované v Ph.Eur.j. Zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže průměrná hladina protilátek v sérech očkovaných ptáků je nejméně 10 000 Ph.Eur.j. v mililitru.

Pátý až sedmý týden po očkování se sbírají vejce pro líhnutí a provádí se níže uvedená zkouška na třítýdenních kuřatech vylíhnutých z těchto vajec. Vejce se opět sbírají koncem snáškového období a zkouška se opakuje na kuřatech starých nejméně 15 dnů vylíhnutých z těchto vajec.

Dvacet pět kuřat od očkovaných slepic a deset kontrolních kuřat téhož chovu a stáří od neočkovaných slepic se podáním do oka infikuje takovým množstvím virulentního kmene viru infekční ptačí burzitidy, které je schopno vyvolat výrazné příznaky onemocnění, včetně změn ve Fabriciově burze, u všech neočkovaných kuřat. Tři až čtyři dny po infekci se všem kuřatům odebere Fabriciova burza. Burzy jsou vyšetřeny na přítomnost infekce histologicky nebo se na přítomnost antigenu infekční ptačí burzitidy vyšetří precipitačním testem v agarovém gelu. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže tři nebo méně kuřat od očkovaných slepic vykazují příznaky infekční ptačí burzitidy. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že onemocní všechna kuřata od neočkovaných slepic.

Jestliže se doporučuje více způsobů podání, provádí se současně s výše uvedenou zkouškou imunogenity zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti na různých skupinách ptáků pro každý doporučený způsob podání. Sérologická odpověď ptáků očkovaných jiným způsobem, než jaký je uveden ve stanovení imunogenity,není významně nižší než odpověď skupiny očkované tímto způsobem.

Zkouška totožnosti

Vakcína vyvolá tvorbu specifických protilátek u kuřat, která nemají protilátky proti viru infekční ptačí burzitidy typ 1.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvojnásobek očkovací dávky se vstříkne jedním z doporučovaných způsobů podání každému z deseti kuřat starých 14 až 28 dnů z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Ptáci se sledují 21 dnů. Neprojeví se abnormální místní nebo celková reakce.

Poznámka: Tato zkouška může být vypuštěna, jestliže se provádí zkouška inaktivace C.

Inaktivace.

A. U vakcíny připravené z kmenů virů adaptovaných na embrya se vstříknou dvě pětiny dávky do alantoidní dutiny nebo na chorioalantoidní membránu deseti 9 až 11 dnů starých kuřecích embryí z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Embrya se inkubují a sledují 6 dnů. Odděleně se odeberou alantoidní tekutiny nebo membrány z živých embryí a z odumřelých embryí kromě těch, která uhynula z nespecifických příčin v průběhu 24 h po podání.

Do alantoidní dutiny nebo na chorioalantoidní membránu každého z deseti 9 až 11 dnů starých SPF embryí se vstříkne po 0,2 ml směsné alantoidní tekutiny nebo rozdrcených chorioalantoidních membrán živých embryí, do každého z deseti dalších embryí po 0,2 ml směsné tekutiny nebo membrán z uhynulých embryí a inkubuje se 6 dnů. Každé embryo se vyšetří na přítomnost lézí infekční ptačí burzitidy.

Jestliže více než 20 % embryí uhyne v jedné z etap, tato etapa se opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže se neobjeví léze infekční ptačí burzitidy a jestliže v žádné opakované zkoušce neuhyne ze specifické příčiny více než 20 % embryí.

Pro zvládnutí cizí bakteriální infekce mohou být ve zkoušce použita antibiotika.

B. U vakcíny připravené z kmenů viru adaptovaných na buněčné kultury se inokuluje 10 dávek na vhodné buněčné kultury. Pokud zkoušený přípravek obsahuje olejové adjuvans, odstraní se vhodným způsobem. Inkubuje se 7 dnů při (38 ± 1) °C. Provede se pasáž na další sadu buněčných kultur a inkubuje se 7 dnů při (38 ± 1) °C. Kultury nevykazují příznaky infekce.

C. U vakcíny připravené z kmenů viru neadaptovaných na embrya nebo buněčné kultury se vstříknou dvě dávky intramuskulárně každému z dvaceti 14 až 28 dnů starých kuřat z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Po 4 dnech se utratí deset kuřat a od každého se odebere Fabriciova burza. Burzy se smísí a homogenizují ve stejném objemu vhodné tekutiny. 1 ml burzálního homogenátu se vstříkne každému z deseti dalších kuřat téhož stáří a původu. 21 dnů poté se mikroskopicky vyšetří Fabriciova burza každého ze zbývajících kuřat první skupiny a každého z kuřat druhé skupiny; nejsou příznaky infekční ptačí burzitidy. Dále nejsou příznaky žádného onemocnění, které by mohlo být přisuzováno vakcíně, a nevyvine se abnormální místní reakce. Kuřata druhé skupiny vyšetřená 21 dnů po podání nemají protilátky proti viru infekční ptačí burzitidy.

Cizí antigeny. Od každého ptáka použitého ve zkoušce bezpečnosti nebo zkoušce inaktivace C se odeberou vzorky séra tři týdny po očkování. Provedou se zkoušky na protilátky proti následujícím infekčním agens metodami předepsanými pro drůbeží chovy prosté specifikovaných patogenů, která jsou určena pro výrobu a kontrolu kvality vakcín (viz *5.2.2*): virus ptačí encefalomyelitidy, viry ptačí leukózy, hemaglutinující ptačí adenovirus, virus infekční bronchitidy, virus infekční laryngotracheitidy, virus influenzy A, virus Markovy choroby, virus newcastleské choroby. Zkoušený přípravek nevyvolává tvorbu protilátek proti těmto virům.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Každé z nejméně deseti kuřat, 4 týdny starých, z chovu prostého specifikovaných patogenů se očkuje jednou dávkou zkoušeného přípravku jedním z doporučovaných způsobů. Po 4 až 6 týdnech se odeberou vzorky séra od každého kuřete a od deseti neočkovaných kontrolních kuřat téhož původu a stáří. Protilátková odpověď se stanoví sérum-neutralizační zkouškou. Účinnost se stanoví porovnáním s přípravkem, kterým je *sérum proti infekční ptačí burzitidě BRP* kalibrované v Ph.Eur.j. Průměrná hladina protilátek v sérech očkovaných kuřat není nižší než 10 000 Ph.Eur.j. v mililitru. V sérech neočkovaných kuřat nejsou protilátky.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede, zda kmen ve vakcíně je adaptován na embrya nebo na buněčné kultury.

Vaccinum bursitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti infekční ptačí burzitidě (nemoci Gumboro) lyofilizovaná

Je to přípravek z oslabeného kmene viru infekční ptačí burzitidy.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Kmen viru se pomnoží buďto v kuřecích embryích (KE) z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*), nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Jsou-li buněčné kultury ptačího původu, získají se z chovů prostých specifikovaných patogenů. Virová suspenze se sklidí, smíchá s vhodnou stabilizující tekutinou a lyofilizuje se.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu se použije pouze takový kmen viru, který je prokazatelně dostatečný v imunogenitě, oslabení i nevratnosti oslabení a nevyvolává imunosupresi. K prokázání účinnosti se může použít následující zkouška (*5.2.7*).

*Imunogenita.*Zkouška popsaná v odstavci stanovení účinnosti je vhodná k prokázání imunogenity.

Zkoušení šarže

Pokud byly zkouška na viry ptačí leukózy a zkoušky na cizí viry při použití buněčných kultur i kuřecích embryí provedeny s dostatečnými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, je možno jejich provádění v rámci rutinní kontroly dalších šarží téže vakcíny vynechat v případě, že tyto šarže byly vyrobeny ze stejného zásobního inokula a pokud k tomu dala souhlas oprávněná autorita. Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s dostatečnými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, je možno jeho provádění v rámci rutinní kontroly dalších šarží téže vakcíny vynechat v případě, že tyto šarže byly vyrobeny ze stejného zásobního inokula a pokud k tomu dala souhlas oprávněná autorita.

Zkoušky totožnosti

Předepsaným způsobem rozpuštěný zkoušený přípravek se smíchá s monospecifickým sérem. Takto upravený přípravek již neinfikuje vnímavá kuřecí embrya stará 9 až 11 dní nebo vnímavé buněčné kultury, do nichž je naočkován.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Z chovu prostého specifikovaných patogenů se vybere nejméně patnáct kuřat v nejnižším stáří, jež je v označení uvedeno pro očkování. Každému kuřeti se nakape do oka deset dávek vakcíny rozpuštěné tak, aby se získala koncentrace vhodná pro zkoušku. Kuřata se pozorují 21 dnů. Jestliže v období pozorování uhyne více než dvě kuřata z příčin, které nelze přisoudit vakcíně, zkouška se opakuje. Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže žádné kuře nemá příznaky onemocnění, žádné z kuřat neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, a jestliže 21 dnů po vakcinaci nevykazuje žádné z kuřat změny Fabriciovy burzy.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*) Rozpuštěná a neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na leukózní viry.

Cizí viry při použití buněčných kultur (*2.6.5*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry provedené na buněčných kulturách.

Cizí viry při použití kuřecích embryí (*2.6.3*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry provedené na kuřecích embryích.

Důkaz cizích antigenů zkouškou na kuřatech (*2.6.6*). Po rozpuštění vyhovuje zkoušce na cizí antigeny provedené na kuřatech.

Bakterie a houby. Vakcíny určené pro parenterální podání a všechny tekutiny s nimi dodávané vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*. U přípravků určených k podání jakýmkoliv jiným způsobem se provede kvantitativní stanovení bakterií a hub; přípravek obsahuje nejvýše jeden saprofytický mikroorganismus na dávku a je prost patogenních mikroorganismů.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Množství virových částic se stanoví na buněčných kulturách nebo inokulací do alantoidní dutiny nebo na alantoidní membránu devítidenních až jedenáctidenních kuřecích embryí nebo do žloutkového vaku pětidenních až šestidenních kuřecích embryí. Jedna dávka zkoušeného přípravku obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá nejnižšímu předepsanému množství viru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použijí se vnímavá kuřata z téhož chovu prostého specifikovaných patogenů a nejnižšího stáří, které je pro vakcínu uvedeno. Každému z nejméně dvaceti kuřat pro každý z uvedených způsobů podání se podá takový objem rozpuštěného přípravku, který obsahuje množství viru, jež odpovídá nejmenšímu deklarovanému titru. Jako kontroly se použije 20 kuřat. Po 14 dnech se infikuje každé kuře nakapáním vhodného množství virulentního viru infekční ptačí burzitidy do oka. Zvířata se pozorují 10 dnů. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže 90 % vakcinovaných kuřat přežívá jak bez příznaků onemocnění, tak bez výrazných změn na Fabriciově burze, jestliže nejméně polovina kontrol vykazuje charakteristické příznaky infekční burzitidy a všechny přežívající kontroly projevují výrazné změny na Fabriciově burze; za výrazné změny u jednoho zvířete jsou považovány takové nálezy, kdy 90 % folikulů vykazuje více než 75% úbytek lymfocytů.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.
Na obalu se uvede stáří zvířat, ve kterém mají být vakcinována.

Vaccinum calicivirosis felinae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti kaliciviróze koček

Je to suspenze z jednoho nebo více vhodných kmenů kaliciviru koček, který byl inaktivován při odpovídajícím zachování imunogenních vlastností nebo z frakcí jednoho nebo více kmenů kaliciviru koček s přiměřenými imunogenními vlastnostmi.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*
Virus se pomnožuje ve vhodných buněčných liniích (*5.2.4*). Suspenze viru se sklidí a inaktivuje.
Zkouška na rezidua infekčního kaliciviru se provede dvěma pasážemi na buněčných kulturách téhož typu, který byl použit při výrobě vakcíny nebo na jiných buněčných kulturách, které jsou prokazatelně nejméně stejně citlivé. Použije se takové množství inaktivovaného viru, které minimálně odpovídá dvaceti pěti dávkám vakcíny. Nezjistí se živý virus.
Vakcína může obsahovat jedno nebo více vhodných adjuvancií.

Výběr složení vakcíny

Vakcína prokazatelně odpovídá zkouškám bezpečnosti a imunogenity na kočkách. K průkazu účinnosti se může použít následující zkouška (*5.2.7*).
Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k průkazu imunogenity vakcíny.

Zkouška účinnosti šarže

Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti se neprovádí při běžném zkoušení šarží vakcíny; provádí se u dané vakcíny při jedné nebo více příležitostech podle rozhodnutí nebo po dohodě s oprávněnou autoritou. Pokud zkouška není provedena, provede se jinou vhodnou validovanou metodou, jejíž kritéria pro přijetí jsou v souladu s šarží vakcíny, která vykázala vyhovující výsledky v předepsané zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti. Následující zkouška se může použít, jestliže byla potvrzena dostatečná korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Použijí se skupiny patnácti séronegativních myší. Každé myši se podá poloviční dávka vakcíny, za 7 dnů se podání opakuje. Za 21 dnů po první injekci se odebere krev a stanoví se hladina protilátek proti kaliciviru koček metodou imunofluorescence. Vyšetřuje se směsný vzorek séra tří myší. Hladina protilátek není průkazně nižší než hladina protilátek získaná s šarží vakcíny, která vykázala vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti.

Zkouška totožnosti

Když se vakcína podá vnímavým zvířatům, vyvolá tvorbu specifických protilátek proti kaliciviru koček.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma kočkám ve stáří 8 až 12 týdnů se podá doporučeným způsobem dvojnásobná vakcinační dávka. Pozorovací doba je 14 dnů. Zvířata zůstávají v dobrém zdravotním stavu a nemají žádné abnormální místní ani systémové reakce.

Inaktivace. Provede se zkouška na reziduální infekční kalicivirus za použití deseti dávek vakcíny a dvou pasáží na buněčných kulturách téhož typu, který byl použit při výrobě vakcíny, nebo na jiných buněčných kulturách, které jsou prokazatelně nejméně stejně citlivé. Nezjistí se živý virus. Pokud vakcína obsahuje adjuvans, které by bránilo provedení zkoušky, je-li to možné, oddělí se adjuvans od tekuté fáze metodou, která neinaktivuje nebo jinak nepřekáží detekci živého viru.

Sterilita. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

S každým kmenem kaliciviru koček obsaženým ve vakcíně se provede stanovení účinnosti.

Použijí se kočky ve stáří 8 až 12 týdnů prosté protilátek proti kaliciviru koček. Deset koček se vakcinuje doporučeným způsobem podle předpisu a podle doporučeného schématu. Deset koček slouží jako kontroly. Za 4 týdny po poslední injekci se podá intranazálně každé vakcinované a kontrolní kočce takové množství virulentního kmene kaliciviru stejného typu, jako je vakcinační kmen, které postačí k vyvolání typických příznaků onemocnění (vysoká teplota, vředy v dutině ústní, dýchací příznaky) nejméně u osmi kontrolních koček. Pozorovací doba je 14 dnů po čelenži. Od druhého do čtrnáctého dne se denně odebírají nosní výplachy k vyšetření na vylučování viru. Denně se zapisuje teplota a příznaky onemocnění, používá se dále uvedený bodový systém. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže součet bodů vakcinovaných koček je významně nižší než u kontrol.

Pozorované příznaky	**Počet bodů**
úhyn	10
depresivní stav	2
teplota 39,5 °C a vyšší	1
teplota 37 °C a nižší	2
vředy (nosní nebo ústní)	
- malé a nečetné	1
- velké a četné	3
nosní výtok	
- slabý	1
- hojný	2
výtok z očí	1
ztráta na hmotnosti	2
vylučování viru (celkový počet dnů)	
- 4 dny a méně	1
- 5 až 7 dnů	2
- více než 7 dnů	3

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum calicivirosis felinae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti kaliciviróze koček lyofilizovaná

Je to přípravek z jednoho nebo více vhodných kmenů kalicivirózy koček.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Virus se pomnožuje ve vhodných buněčných liniích (*5.2.4*). Suspenze viru se sklidí a smíchá s vhodným stabilizačním roztokem. Směs se potom lyofilizuje.

Výběr vakcinačního kmene

Vakcinační kmen by měl být prokazatelně odpovídající z hlediska bezpečnosti (včetně bezpečnosti březích chovných samic, pokud použití u nich není kontraindikováno), nevratností virulence a z hlediska imunogenity. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít tyto zkoušky.

Bezpečnost. Deseti kočkám bez protilátek proti kaliciviru koček, které jsou v minimálním věku uvedeném pro vakcinaci, se doporučeným způsobem podá desetinásobek maximálního titru viru, který lze očekávat u šarže vakcíny. Kočky se pozorují 21 dnů. Kmen vyhovuje zkoušce, jestliže zvířata zůstávají v dobrém zdravotním stavu a nemají žádné abnormální místní ani celkové reakce.

Nevratnost virulence. Dvěma kočkám, které nemají protilátky proti kaliciviru koček, se doporučeným způsobem podá množství viru (např. asi deset dávek), které umožní maximální získání viru při pasážích dále popsaných. Za 5 dnů se kočky usmrtí, odebere se nosní hlen, mandle a průdušnice, smíchají se a homogenizují v 10 ml tlumivého fyziologického roztoku, směs se dekantuje. Supernatant se intranazálně očkuje dvěma dalším kočkám. Tento postup se opakuje pětkrát. Přítomnost viru se potvrzuje v každé pasáži. Pokud virus není znovu získán, provede se druhá série pasáží. Kočky v poslední pasáži se pozorují 21 dnů a porovnávají se reakce, které byly získány ve výše popsané zkoušce bezpečnosti. Kmen vyhovuje zkoušce, pokud nejsou důkazy o zvýšení jeho virulence ve srovnání s původním virem.

Imunogenita. K průkazu imunogenity je vhodná zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti.

Pokud byla zkouška účinnosti provedena s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Rekonstituovaná vakcína po neutralizaci jedním nebo více monospecifickými séry již neinfikuje citlivé buněčné kultury, do nichž je naočkována.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým kočkám ve stáří 8 až 12 týdnů se doporučeným způsobem podá deset dávek vakcíny ve vhodném objemu a kočky se pozorují 14 dní. Zvířata zůstanou v dobrém zdravotním stavu a nemají žádné neobvyklé místní ani systémové reakce.

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu, předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Mykoplazmata (*2.6.7*). Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Cizí viry. Vakcína se neutralizuje jedním nebo více monospecifickými séry a očkuje se do vhodných buněčných kultur. Provede se nejméně jedna pasáž a kultury se udržují 14 dnů. Kultury se vyšetří na cytopatické efekty a provede se zkouška hemadsorpce. V buněčných kulturách se nezjistí příznaky kontaminace.

Titr viru. Rekonstituovaná vakcína se titruje na citlivých buněčných kulturách při teplotě příznivé pro replikaci viru. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

S každým kmenem kaliciviru koček obsaženým ve vakcíně se provede stanovení účinnosti.

Použijí se kočky ve stáří 8 až 12 týdnů prosté protilátek proti kaliciviru koček. Deset koček se vakcinuje jedním z doporučených způsobů a podle doporučeného schématu. Deset koček slouží jako kontroly. Za 4 týdny po poslední injekci se podá intranazálně každé vakcinované a kontrolní kočce takové množství virulentního kmene kaliciviru stejného typu, jako je vakcinační kmen, které postačí k vyvolání typických příznaků onemocnění (vysoká teplota, vředy v dutině ústní, dýchací příznaky) nejméně u osmi kontrolních koček. Pozorovací doba je 14 dnů po čelenži. Od druhého do čtrnáctého dne se denně odebírají nosní výplachy k vyšetření na vylučování viru. Denně se

zapisuje teplota a příznaky onemocnění, používá se dále uvedený bodový systém. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže součet bodů vakcinovaných koček je významně nižší než u kontrol.

Pozorované příznaky	**Počet bodů**
úhyn	10
depresivní stav	2
teplota 39,5 °C a vyšší	1
teplota 37 °C a nižší	2
vředy (nosní nebo ústní)	
- malé a nečetné	1
- velké a četné	3
nosní výtok	
- slabý	1
- hojný	2
výtok z očí	1
ztráta na hmotnosti	2
vylučování viru (celkový počet dnů)	
- 4 dny a méně	1
- 5 až 7 dnů	2
- více než 7 dnů	3

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum cholerae

Vakcína proti choleře

Je to homogenní suspenze vhodného kmene nebo kmenů *Vibrio cholerae* obsahující nejméně $8 \cdot 10^9$ bakterií v lidské dávce. Ta nepřesahuje 1,0 ml.

Výroba

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Vakcína obsahuje směs stejných částí připravených ze dvou hlavních sérologických typů Inaba a Ogawa v S-fázi. Oba typy mohou být klasického biotypu buďto s biotypem El-Tor, nebo bez něho. Přípravek může obsahovat jeden kmen nebo více kmenů každého typu. Všechny kmeny obsahují kromě svých O-antigenů také termostabilní O-antigen společný typům Inaba a Ogawa. Jestliže se použije více kmenů než po jednom kmenu od typů Inaba a Ogawa, mohou být vybrány tak, aby obsahovaly jiné O-antigeny navíc. Světová zdravotnická organizace doporučuje nové kmeny, jež se mohou, je-li třeba, použít v souladu s platnými předpisy signatářských států Konvence o vypracování Evropského lékopisu.V souladu s poža-

davky očkovacích certifikátů pro mezinárodní cestování obsahuje vakcína nejméně 8 . 10 ^{9}organismů klasického biotypu.

Každý kmen se kultivuje odděleně. Bakterie se inaktivují buď zahřátím suspenze (např. 1 h na 56 °C), nebo působením formaldehydu nebo fenolu, či kombinací fyzikálních a chemických metod.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*): vstříkne se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

Zkoušky totožnosti

Totožnost se dokazuje specifickými aglutinačními zkouškami.

Zkoušky na čistotu

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 5 g/l; zkouší se u přípravků, u nichž byl při výrobě fenol použit.

Tvorba protilátek. Zkouší se schopnost vyvolat tvorbu protilátek (např. aglutinačních, vibriocidních nebo hemaglutinačních) u morčat, králíků nebo myší. Zkoušený přípravek se podá skupině nejméně šesti zvířat. Na konci období, které je zapotřebí pro největší tvorbu protilátek, stanoveného při předběžných zkouškách se zvířatům odebere sérum a jednotlivě se titrují vhodnými metodami příslušné protilátky. Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže každý sérotyp vyvolal významnou protilátkovou odpověď.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení se uvede:
- použitá inaktivační metoda,
- počet bakterií v lidské dávce.

Vaccinum cholerae cryodesiccatum

Lyofilizovaná vakcína proti choleře

Je to přípravek obsahující vhodný kmen nebo kmeny *Vibrio cholerae.* Rozpuštěn podle návodu v označení tvoří stejnorodou suspenzi obsahující nejméně 8 . 10 ^{9}bakterií v lidské dávce. Ta nepřesahuje 1,0 ml rozpuštěné vakcíny.

Výroba

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Vakcína obsahuje směs stejných částí připravených ze dvou hlavních sérologických typů Inaba a Ogawa v S-fázi. Oba typy mohou být klasického biotypu buďto s biotypem El-Tor, nebo bez něho. Přípravek může obsahovat jeden kmen

nebo více kmenů každého typu. Všechny kmeny obsahují kromě svých O-antigenů také termostabilní O-antigen společný typům Inaba a Ogawa. Jestliže se použije více kmenů než po jednom kmenu od typů Inaba a Ogawa, mohou být vybrány tak, aby obsahovaly jiné O-antigeny navíc. Světová zdravotnická organizace doporučuje nové kmeny, jež se mohou, je-li třeba, použít v souladu s platnými předpisy signatářských států Konvence o vypracování Evropského lékopisu. V souladu s požadavky očkovacích certifikátů pro mezinárodní cestování obsahuje vakcína nejméně $8 \cdot 10^9$ organismů klasického biotypu.

Každý kmen se kultivuje odděleně. Bakterie se inaktivují buďto zahřátím suspenze (např. 1 h na 56 °C), nebo působením formaldehydu, nebo kombinací fyzikálních a chemických metod. Fenol se při výrobě nepoužívá. Vakcína se plní do sterilních nádobek a lyofilizuje, až obsah vlhkosti dosáhne hodnoty příznivé pro stabilitu vakcíny. Nádobky se pak uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*): vstříkne se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

Zkouška totožnosti

Přípravek se rozpustí podle návodu a jeho totožnost se dokazuje specifickými aglutinačními zkouškami.

Zkoušky na čistotu

Tvorba protilátek. Zkouší se schopnost vyvolat tvorbu protilátek (např. aglutinačních, vibriocidních nebo hemaglutinačních) u morčat, králíků nebo myší. Zkoušený přípravek se podá skupině nejméně šesti zvířat. Na konci období, které je zapotřebí pro největší tvorbu protilátek, stanoveného při předběžných zkouškách se zvířatům odebere sérum a jednotlivě se titrují vhodnými metodami příslušné protilátky. Zkoušený přípravek vyhovuje, jestliže každý sérotyp vyvolal významnou protilátkovou odpověď.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení se uvede:

- použitá inaktivační metoda,
- počet bakterií v lidské dávce.

Vaccinum clostridii botulini ad usum veterinarium

Vakcína proti Clostridium botulinum pro veterinární použití

Synonymum. Očkovací látka proti Clostridium botulinum pro veterinární použití

Připravuje se z kultury *Clostridium botulinum* typ C nebo D v tekuté živné půdě nebo ze směsi těchto typů. Kultura nebo její filtrát či směs obou se inaktivuje tak, aby se odstranila toxicita, ale imunogenita zůstala zachována.

Přípravek se může adsorbovat, precipitovat nebo koncentrovat. Může se přidat vhodné adjuvans a přípravek se může lyofilizovat.

Zkouška totožnosti, zkoušky na čistotu a stanovení účinnosti se provádí na tekutých přípravcích a také na lyofilizovaných přípravcích po rozpuštění podle návodu.

Zkouška totožnosti

Když se přípravek vstříkne zdravým a vnímavým zvířatům,vyvolá tvorbu specifických protilátek proti typu nebo typům *Cl. botulinum*, z nichž je vakcína připravena.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě zdravá a vnímavá zvířata toho druhu, pro který je přípravek určen. Každému z nich se vstříkne doporučeným způsobem dvojnásobek maximální dávky uvedené na štítku. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní nebo systémová reakce.

Zbytková toxicita. Pěti myším o hmotnosti 17 g až 22 g se podkožně vstříkne po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní nebo systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Použijí se zdravé myši hmotnosti 18 g až 20 g ze stejného chovu. K čelenži se použije toxin *Cl. botulinum* toho typu, který byl použit k přípravě vakcíny; jeho dávka odpovídá 25násobku 50% paralytické dávky. 50% paralytická dávka je dávka toxinu, která po intraperitoneální aplikaci způsobuje během sedmidenní sledovací doby paralýzu u 50 % myší. Jestliže byl zkoušený přípravek připraven ze dvou typů toxinu, stanoví se účinnost pro oba toxiny. Zkoušený přípravek se ředí 1 : 8 pomocí roztoku chloridu sodného (9 g/l). Roztok se podává podkožně po 0,2 ml dvaceti myším. Za 21 dní se provede intraperitoneální čelenž dvaceti vakcinovaných a deseti nevakcinovaných kontrolních zvířat, která se pozorují 7 dní, a zaznamenává se počet zvířat, u kterých se projevily příznaky botulismu. Po dobu pozorování mají všechny kontroly příznaky botulismu. Přípravek vyhovuje, pokud je ve vakcinované skupině nejméně 80% protekce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede:

- typ nebo typy *Cl. botulinum*, z kterých byl přípravek vyroben,
- zda jde o toxoid nebo vakcínu připravenou z celé inaktivované kultury, či směsi dvou kultur,
- že přípravek se před použitím roztřepe.

Vaccinum clostridii chauvoei ad usum veterinarium

Vakcína proti Clostridium chauvoei pro veterinární použití

Připravuje se z kultury jednoho či více vhodných kmenů *Clostridium chauvoei* v tekuté živné půdě. Kultura se inaktivuje tak, aby se odstranila toxicita, ale imunogenita zůstala zachována. K inaktivované kultuře se může přidat vhodné adjuvans.

Zkouška totožnosti

Přípravek chrání vnímavé druhy zvířat proti infekci *Clostridium chauvoei*.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě zdravá a vnímavá zvířata toho druhu, pro který je přípravek určen. Každému z nich se vstříkne doporučeným způsobem dvojnásobek nejvyšší dávky uvedené v označení. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná výrazná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Nejméně deseti morčatům o hmotnosti 350 g až 450 g se podkožně vstříkne množství nepřesahující nejnižší dávku uvedenou v označení jako první dávka. Po 28 dnech se těmto zvířatům vstříkne množství nepřesahující nejmenší dávku uvedenou v označení jako druhá dávka. Za 14 dní po revakcinaci se vakcinovaným i pěti nevakcinovaným kontrolním morčatům nitrosvalově vstříkne vhodné množství virulentní kultury nebo suspenze spór *Cl. chauvoei* aktivovaných, je-li třeba, aktivačním agens, jako je chlorid vápenatý. Přípravek vyhovuje, pokud během pěti dnů žádné z vakcinovaných morčat neuhyne na infekci *Cl. chauvoei* a naopak všechny kontroly uhynou do 48 h po čelenži virulentní kulturou nebo 72 h po čelenži suspenzí spór. Uhyne-li vakcinované morče, zkouška se opakuje. Přípravek vyhovuje, jestliže v druhé zkoušce neuhynou žádná morčata z vakcinované skupiny a kontroly uhynou do 48 h po čelenži virulentní kulturou nebo do 72 h po čelenži suspenzí spór.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede, že přípravek se před použitím roztřepe.

Vaccinum clostridii novyi B ad usum veterinarium

Vakcína proti Clostridium novyi (typ B) pro veterinární použití

Připravuje se z tekuté kultury vhodného kmene *Clostridium novyi* (dřívější název: *Clostridium oedematiens*) (typ B). Celá kultura nebo její filtrát nebo směs obou se inaktivuje tak, aby se odstranila toxicita, ale imunogenita zůstala zachována.

K toxoidům nebo inaktivovaným kulturám se může přidat vhodné adjuvans po zahuštění, bylo-li nutné.

Zkouška totožnosti

Když se přípravek vstříkne zdravému a vnímavému zvířeti, podněcuje tvorbu antitoxinu novyi alfa.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma ovcím se doporučeným způsobem vstříkne dvojnásobek nejvyšší dávky uvedené v označení. Zvířata se pozorují nejméně 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

Zbytková toxicita. Pěti myším hmotnosti 17 g až 22 g se podkožně vstříkne po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná výrazná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Nejméně deseti zdravým králíkům starým tři až šest měsíců se podkožně vstříkne zkoušený přípravek v dávce, která nepřesahuje nejnižší první dávku uvedenou v označení. Za 21 až 28 dní se provede přeočkování dávkou, která nepřesahuje nejnižší dávku předepsanou jako druhá dávka uvedenou v označení. Za 10 až 14 dní po očkování se králíkům odebere krev a vytvoří se směsný vzorek sér. Účinnost směsného vzorku sér je nejméně 3,5 m.j. v mililitru.

Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující alfa-toxin *Cl. novyi* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost směsného vzorku sér králíků se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné dávky alfa-toxinu *Cl. novyi* s dávkou referenčního alfa-antitoxinu *Cl. novyi*, kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, nezbytnou k vytvoření stejné ochrany. K tomuto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek alfa-toxinu *Cl. novyi*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví proti referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného séra se stanoví porovnáním s referenčním přípravkem za použití zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu asi pětidenní kultury *Cl. novyi* typu B v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Toxin se vybírá podle stanovení dávky L+/10 a LD_{50} pro myši. Doba pozorování je 72 h. Vhodný alfa-toxin obsahuje nejméně jednu dávku L+/10 v 0,05 mg a nejméně 10 LD_{50} v jedné dávce L+/10.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Ve vhodné tekutině se připraví roztok referenčního přípravku tak, aby v 1 ml obsahoval 1 m.j. Roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině se připraví tak, aby v 1,0 ml obsahoval přesně známé množství, tj. 1 mg. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m.j.) a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 2,0 ml a nechají se 60 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g, každé se podkožně nebo nitrosvalově vstříkne 0,2 ml a pozorují se 72 h. Uhynou-li všechny myši, je množství toxinu obsažené v 0,2 ml směsi vyšší než zkušební dávka. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu obsažené v 0,2 ml směsi nižší než zkušební dávka.

Potom se připraví čerstvé směsi tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku referenčního přípravku (1 m.j.) a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu (v řadě se sousedící objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod). Směsi se nechají 60 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, každé se nitrosvalově nebo podkožně vstříkne 0,2 ml a pozorují se 72 h. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky u jednotlivých směsí se sečtou. Tak se získá řada výsledných součtů, z nichž každý představuje úmrtnost způsobenou směsí stejného složení. Zkušební dávka toxinu je množství obsažené v 0,2 ml té směsi, která způsobí úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž se podala.

Stanovení účinnosti králičích sér.

Předběžná zkouška: Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 1,0 ml obsahoval desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby každá směs obsahovala 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 2,0 ml a nechají se 60 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně 2 myši, každé se nitrosvalově nebo podkožně vstříkne 0,2 ml a pozorují se 72 h. Neuhyne-li žádná myš, obsahuje 0,2 ml směsi více než 0,1 m.j. Uhynou-li všechny myši, obsahuje 0,2 ml směsi méně než 0,1 m.j.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra (v řadě se sousedící objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod stanovený v předběžné zkoušce). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi tak, aby 2,0 ml každé směsi obsahovaly 1,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Všechny směsi se nechají 60 min stát při pokojové teplotě a pro každou se použijí nejméně dvě myši, přičemž se dále postupuje tak, jak je popsáno v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m.j. v 0,2 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 0,1 m.j. v 0,2 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných stanovení. Stanovení jsou platná pouze v případě, že výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) stanovení účinnosti jsou stanoveny takto:
- 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5 % až 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku,
- 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede:

- je-li přípravek toxoid nebo vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo je-li to směs obou,
- že se před použitím přípravek roztřepe.

Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium

Vakcína proti Clostridium perfringens pro veterinární použití

Připravuje se z tekuté kultury vhodných kmenů *Clostridium perfringens* typu B, *Clostridium perfringens* typu C nebo *Clostridium perfringens* typu D nebo ze směsi těchto typů. Kultura nebo její filtrát nebo jejich směs se inaktivuje tak, aby se odstranila toxicita, ale imunogenita zůstala zachována.

K toxoidům a inaktivovaným kulturám se může přidat vhodné adjuvans.

Zkoušky totožnosti

Typ B. Když se přípravek vstříkne zdravým a vnímavým zvířatům, vyvolá tvorbu antitoxinů beta a epsilon.

Typ C. Když se přípravek vstříkne zdravým a vnímavým zvířatům, vyvolá tvorbu antitoxinu beta.

Typ D. Když se přípravek vstříkne zdravým a vnímavým zvířatům, vyvolá tvorbu antitoxinu epsilon.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě zdravá vnímavá zvířata toho druhu, pro který je přípravek určen. Doporučeným způsobem se každému zvířeti vstříkne dvojnásobek nejvyšší dávky uvedené v označení. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

Zbytková toxicita. Pěti myším o hmotnosti 17 g až 22 g se podkožně vstříkne po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Nejméně deseti zdravým králíkům starým tři až šest měsíců se podkožně vstříkne zkoušený přípravek v dávce, která nepřesahuje nejnižší předepsanou první dávku. Za 21 až 28 dní se provede přeočkování dávkou, která nepřesahuje nejnižší předepsanou druhou dávku. Za 10 až 14 dní po přeočkování se králíkům odebere krev a vytvoří se směsný vzorek sér.

Typ B. Účinnost směsného vzorku sér je nejméně 10 m.j. beta-antitoxinu a nejméně 5 m.j. epsilon-antitoxinu v mililitru.

Typ C. Účinnost směsného vzorku sér je nejméně 10 m.j. beta-antitoxinu v mililitru.

Typ D. Účinnost směsného vzorku sér je nejméně 5 m.j. epsilon-antitoxinu v mililitru.

Mezinárodní standard pro Clostridium perfringens beta-antitoxin. Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující beta-toxin *Clostridium perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Mezinárodní standard pro Clostridium perfringens epsilon-antitoxin. Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující epsilon-toxin *Clostridium perfringens* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost směsného vzorku sér králíků se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem neměnné zkušební dávky beta-toxinu *Clostridium perfringens* nebo epsilon-toxinu *Clostridium perfringens* s dávkou referenčního beta-antitoxinu *Clostridium perfringens* nebo epsilon-antitoxinu *Clostridium perfringens* (podle toho, co je vhodné) kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, nezbytnou k vytvoření stejné ochrany. K tomuto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek beta- nebo epsilon-toxinu *Clostridium perfringens.* Dávka zkušebního toxinu se stanoví proti vhodnému referenčnímu přípravku; účinnost zkoušeného séra se stanoví porovnáním s referenčním přípravkem za použití vhodného zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu čerstvé kultury *Clostridium perfringens* typu B, C nebo D v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou. Podle potřeby se použije beta- nebo epsilon-toxin.

Toxin se vybírá podle stanovení dávky L+ a LD_{50}u beta-toxinu nebo dávky L+/10 a LD_{50}u epsilon-toxinu. Stanovení se provádí na myších a doba jejich pozorování je 72 h.

Vhodný beta-toxin obsahuje nejméně jednu dávku L+ v 0,2 mg a nejméně 25 LD_{50}v jedné L+ dávce. Vhodný epsilon-toxin obsahuje nejméně jednu dávku L+/10 v 0,005 mg a nejméně 20 LD_{50} v jedné L+/10 dávce.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Ve vhodné tekutině se připraví roztok referenčního přípravku tak, aby v 1 ml obsahoval 5 m.j. beta-antitoxinu *Clostridium perfringens* a 0,5 m.j. epsilon- antitoxinu *Clostridium perfringens.*

Roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině se připraví tak, aby 1,0 ml obsahoval přesně známé množství, tj. 10 mg pro beta-toxin a 1 mg pro epsilon-toxin. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 30 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml; pozorují se 72 h. Uhynou-li všechny myši, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi vyšší než zkušební dávka. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi nižší než zkušební dávka. Potom se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku a jeden z řady stoupajících objemů zkušebního toxinu (v řadě se sousedící objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod). Směsi se nechají 30 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml; pozorují se nejméně 72 h. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky u jednotlivých směsí se sečtou. Tak se získá řada výsledných součtů, z nichž každý představuje úmrtnost způsobenou směsí stejného složení. Zkušební dáv-

ka toxinu je množství obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobí úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž se podala.

Stanovení účinnosti králičích sér.

Předběžná zkouška: Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupající objemů zkoušeného séra. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 30 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml; pozorují se 72 h. Neuhyne-li žádná myš, obsahuje 0,5 ml směsi více než 1 m.j. beta-antitoxinu nebo 0,1 m.j. epsilon-antitoxinu. Uhynou-li všechny myši, obsahuje 0,5 ml směsi méně než 1 m.j. beta-antitoxinu nebo 0,1 m.j. epsilon-antitoxinu.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby 0,5 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra (v řadě se stoupající objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod stanovený v předběžné zkoušce). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Všechny směsi se nechají 30 min stát při pokojové teplotě a pro každou se použijí nejméně dvě myši, při čemž se dále postupuje tak, jak je popsáno v předběžné zkoušce.

Beta-antitoxin. Zkoušená směs, která obsahuje 1 m.j. v 0,5 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 1 m.j. v 0,5 ml.

Epsilon-antitoxin. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m.j. v 0,5 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 0,1 m.j. v 0,5 ml.

Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) stanovení účinnosti jsou stanoveny takto:
- 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5 % až 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku,
- 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede:
- typ nebo typy *Clostridium perfringens*, ze kterých je vakcína připravena,
- je-li přípravek toxoid nebo vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo je-li to směs obou,
- že se před použitím přípravek roztřepe.

Vaccinum clostridii septici ad usum veterinarium

Vakcína proti Clostridium septicum pro veterinární použití

Připravuje se z tekuté kultury vhodného kmene mikroba *Clostridium septicum*. Celá kultura nebo její filtrát nebo směs obou se inaktivuje tak, aby se odstranila toxicita, ale imunogenita zůstala zachována.

K toxoidům a inaktivovaným kulturám se může přidat vhodné adjuvans.

Zkouška totožnosti

Když se přípravek vstříkne zdravým a vnímavým zvířatům, vyvolá tvorbu antitoxinu proti *Cl. septicum*.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě zdravá vnímavá zvířata jednoho z druhů, pro které je přípravek určen. Doporučeným způsobem se každému zvířeti vstříkne dvojnásobek nejvyšší dávky uvedené v označení. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

Zbytková toxicita. Pěti myším hmotnosti 17 g až 22 g se podkožně vstříkne po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují 7 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Nejméně deseti zdravým králíkům starým tři až šest měsíců se podkožně vstříkne zkoušený přípravek v dávce, která nepřesahuje nejnižší první dávku uvedenou v označení. Za 21 až 28 dní se provede přeočkování dávkou, která nepřesahuje nejnižší druhou dávku uvedenou v označení. Za 10 až 14 dní po přeočkování se králíkům odebere krev a vytvoří se směsný vzorek sér. Účinnost směsného vzorku sér je nejméně 2,5 m.j. v mililitru.

Mezinárodní jednotka je specifická účinnost neutralizující toxin *Cl. septici* obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost směsného vzorku sér králíků se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat před toxickým účinkem dávky toxinu *Cl. septicum* s dávkou referenčního přípravku antitoxinu *Cl. septicum*, kalibrovaného v mezinárodních jednotkách, nezbytnou k vytvoření stejné ochrany. K tomuto porovnání je zapotřebí vhodný přípravek toxinu *Cl. septicum*, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví proti referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného séra se stanoví porovnáním s referenčním přípravkem za použití zkušebního toxinu.

Příprava zkušebního toxinu. Zkušební toxin se připraví ze sterilního filtrátu jednodenní až třídenní kultury *Cl. septicum* v tekuté živné půdě a vysuší se vhodnou metodou.

Toxin se vybírá podle stanovení dávky L+/5 a LD_{50} pro myši. Doba pozorování je 72 h. Vhodný toxin obsahuje nejméně jednu dávku L+/5 a 1,0 mg a nejméně 10 LD_{50} v jedné dávce L+/5.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Ve vhodné tekutině se připraví roztok referenčního přípravku tak, aby v 1 ml obsahoval 1,0 m.j. Roztok zkušebního toxinu ve vhodné tekutině se připraví tak,

aby v 1,0 ml obsahoval přesně známé množství, např. 4 mg. Připraví se směsi roztoků referenčního přípravku a zkušebního toxinu tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (2 m.j.) a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a uchovávají se 60 min při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši hmotnosti 17 g až 22 g a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml; pozorují se 72 h.

Uhynou-li všechny myši, je množství toxinu, obsažené v 0,5 ml směsi vyšší než zkušební dávka. Neuhyne-li žádná myš, je množství toxinu obsažené v 0,5 ml směsi nižší než zkušební dávka.

Potom se připraví čerstvé směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku referenčního přípravku (2 m.j.) a jeden z řady stoupajících objemů roztoku zkušebního toxinu (v řadě se sousedící objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod). Směsi se nechají 60 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml; pozorují se 72 h. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a výsledky u jednotlivých směsí se sečtou. Tak se získá řada výsledných součtů, z nichž každý představuje úmrtnost způsobenou směsí stejného složení. Zkušební dávka toxinu je množství obsažené v 0,5 ml té směsi, která způsobí úhyn poloviny celkového počtu myší, jimž se podala.

Stanovení účinnosti králičích sér.

Předběžná zkouška: Ve vhodné tekutině se rozpustí takové množství zkušebního toxinu, aby 2,0 ml obsahovaly desetinásobek zkušební dávky (roztok zkušebního toxinu). Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby každá směs obsahovala 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra. Směsi se doplní vhodnou tekutinou na 5,0 ml a nechají se 60 min stát při pokojové teplotě. Pro každou směs se použijí nejméně 2 myši a každé se intravenózně nebo intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml; pozorují se 72 h. Neuhyne-li žádná myš, obsahuje 0,5 ml směsi více než 0,2 m.j. Uhynou-li všechny myši, obsahuje 0,5 ml směsi méně než 0,2 m.j.

Konečná zkouška: Připraví se směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra (v řadě se sousedící objemy mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod stanovený v předběžné zkoušce). Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi tak, aby 5,0 ml každé směsi obsahovalo 2,0 ml roztoku zkušebního toxinu a jeden z řady stoupajících objemů roztoku referenčního přípravku. Všechny směsi se nechají 60 min stát při pokojové teplotě a pro každou se použijí nejméně dvě myši, přičemž se dále postupuje tak, jak je popsáno v předběžné zkoušce. Zkoušená směs, která obsahuje 0,2 m.j. v 0,5 ml, je ta směs, která usmrtí shodný nebo téměř shodný počet myší jako referenční směs, která obsahuje 0,2 m.j. v 0,5 ml. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) stanovení účinnosti jsou stanoveny takto:
- 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5 % až 109 %, použila-li se čtyři zvířata na dávku,
- 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede:

- je-li přípravek toxoid, nebo vakcína připravená z celé inaktivované kultury, nebo směs obou,
- že se před použitím přípravek roztřepe.

Vaccinum colibacillosis fetus a partu recentis inactivatum ad ruminantes

Inaktivovaná vakcína proti neonatální kolibacilóze přežvýkavců

Synonymum. Inaktivovaná očkovací látka proti neonatální kolibacilóze přežvýkavců

Je to přípravek z kultur jednoho nebo více vhodných kmenů *Escherichia coli* obsahujících jeden nebo více adhezinů nebo enterotoxinů. Podává se injekčně samicím k ochraně nově narozeného potomstva před enterální formou kolibacilózy.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.* Výrobní kmeny *E. coli* se pomnožují odděleně ve vhodné živné půdě. Buňky nebo toxiny se zpracují tak, aby byly neškodné, a pak se smíchají. Vakcína může obsahovat jedno nebo více adjuvancií.

Výběr složení vakcíny

Kmeny *E. coli* používané k výrobě vakcíny prokazatelně vyhovují exprimovanými antigeny a vakcína rovněž vyhovuje bezpečností a imunogenitou. Tyto vlastnosti se mohou prokázat následujícími zkouškami.

Exprese antigenů. Exprese antigenů, které podněcují ochranou imunitní odpověď, se ověří vhodnými imunochemickými metodami (*2.7.1*) na antigenu z každého vakcinačního kmene získaném za podmínek použitých při výrobě vakcíny.

Bezpečnost. Deseti březím samicím každého druhu, pro který je vakcína určena, se podá dvojitá dávka vakcíny. Po intervalu uvedeném v označení na obalu se podá jedna dávka. Zvířata se pozorují až do porodu. Nezjistí se žádné abnormální místní ani systémové reakce, ani se nezjistí vliv na březost a potomstvo.

Bezpečnost se dokazuje v terénních pokusech pro každý druh, pro který je vakcína určena, podáním určené dávky nejméně šedesáti zvířatům ze třech různých chovů a to způsobem a podle schématu uvedeným v označení na obalu. Nejméně třicet zvířat ze stejných chovů tvoří kontrolní skupinu. Zvířata se pozorují 14 dní po poslední dávce. Neprojeví se žádné abnormální místní ani celkové reakce, zejména nedojde ke zvýšení teploty o více než 1,5 °C po dva dny od podání každé dávky vakcíny.

Imunogenita. Vhodnost vakcíny z hlediska imunogenity se prokáže pro každý druh, pro který je určena. Může se to dokázat zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Zkouška účinnosti šarže

Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti se neprovádí při rutinním zkoušení šarží vakcíny. S danou vakcínou se provede jednou nebo několikrát podle rozhodnutí nebo souhlasu

oprávněné autority. Kde se neprovede tato zkouška, použije se vhodná validovaná zkouška. Kritéria pro přijetí se stanoví ve vztahu k šarži, která dává vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti. Následující zkouška se může použít, je-li statisticky prokázána korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

K dosažení platné zkoušky může být nezbytné provést zkoušku na několika skupinách zvířat, z nichž každá dostane odlišnou dávku. Pro každou dávku se zkouška provede takto. Nejméně pět králíků, morčat nebo myší prostých specifických protilátek proti deklarovaným antigenům se vakcinuje jedinou injekcí vhodné dávky. Další dva králíci, morčata nebo myši tvoří nevakcinovanou kontrolu. Jestliže vakcinační schéma v označení na obalu požaduje revakcinaci, může se použít doporučené vakcinační schéma, jestliže se prokázalo, že to tvoří zkušební systém vhodné citlivosti. V daném intervalu v rozmezí 14 až 21 dní po poslední injekci se všem zvířatům odebere krev a připraví se vzorky séra. K měření protilátkové odpovědi na každý ochranný antigen, který je uveden v označení na obalu, se použije vhodný validovaný test jako na enzymově imunosorbentové stanovení (ELISA). Hladina protilátek není signifikantně nižší než hladina u šarží, které dávaly vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti, a ani se nezjistí signifikantní vzestup titru protilátek u kontrol.

Kde nejsou dostupná seronegativní zvířata, mohou se použít séropozitivní. Při vývoji zkoušky se séropozitivními zvířaty je nutná zvláštní péče při validaci systému, aby bylo stanoveno, že zkouška je vhodně citlivá a aby se určila kritéria pro splnění, selhání a pro opakování zkoušky. Bude nezbytné vzít v úvahu rozmezí vhodných prevakcinačních titrů a určit ve vztahu k nim přijatelný nejmenší vzestup po vakcinaci.

Zkouška šarže na bakteriální endotoxiny

Zkouška na bakteriální endotoxiny (*2.6.14*) se provádí u hotové šarže nebo, když vlastnosti adjuvancia brání provedení zkoušky, u várky antigenu nebo u směsi várek antigenu bezprostředně před přidáním adjuvancia. Vakcíny pro ovce prokazatelně obsahují nejvýše $5 \cdot 10^4$ m.j. endotoxinu v jedné dávce a vakcíny určené pro skot nebo kozy obsahují nejvýše $2{,}5 \cdot 10^5$ m.j. endotoxinu v jedné dávce, pokud nebylo prokázáno, že vyšší množství endotoxinu je pro jeden nebo druhý druh bezpečné.

Zkouška totožnosti

U zvířat prostých specifických protilátek proti antigenům uvedeným v označení na obalu podněcuje vakcína tvorbu protilátek proti těmto antigenům.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým zvířatům jednoho z těch druhů, pro které je vakcína určena, se každému vstříkne dvojnásobná dávka vakcíny způsobem uvedeným v označení na obalu. Za 14 dní se každému zvířeti podá jedna další dávka. Zvířata se pozorují dalších 14 dní. Neprojeví se žádná výrazná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Stanovení se provede s čelenžním kmenem, který představuje všechny typy antigenů, proti nimž má vakcína chránit. Jestliže není dosažitelný jeden kmen se všemi potřebnými antigeny, opakuje se stanovení s různými čelenžními kmeny.

Použije se patnáct vnímavých zvířat jednoho z těch druhů, pro které je vakcína určena; tato zvířata jsou prosta specifických protilátek proti antigenům uvedeným v označení na obalu. Z nich se namátkově vybere deset, které se v březosti vakcinují dávkou a způsobem uvedeným v označení na obalu. Za 12 h po narození se z mláďat, která již dostala kolostrum, vezme deset zdravých od vakcinovaných zvířat a pět mláďat od nevakcinovaných kontrol. Mláďata se perorálně čelenžují patogenním kmenem *E. coli*, který není totožný s kmenem použitým při výrobě vakcíny. Pak se mláďata vrátí jejich matkám. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže nejméně čtyři z pěti mláďat od nevakcinovaných kontrol uhynou nebo mají vážné příznaky nemoci. Přípravek vyhovuje, jestliže nejvýše jedno mládě od vakcinovaných zvířat uhyne nebo má vážné příznaky nemoci a jestliže nejvýše tři další mají lehký průjem, který trvá nejdéle tři dny.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede antigen nebo antigeny obsažené ve vakcíně, které podněcují ochrannou imunitní odpověď.

Vaccinum colibacillosis fetus a partu recentis inactivatum ad suem

Inaktivovaná vakcína proti kolibacilóze novorozených selat

Synonymum. Inaktivovaná očkovací látka proti kolibacilóze novorozených selat

Je to přípravek z kultur jednoho nebo více vhodných kmenů *Escherichia coli* obsahujících jeden nebo více adhezinů či enterotoxinů. Podává se injekčně prasnicím a prasničkám k ochraně nově narozených selat před enterální kolibacilózou.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Výrobní kmeny *E. coli* se pomnožují odděleně ve vhodné živné půdě. Buňky nebo toxiny se zpracují tak, aby byly neškodné, a pak se smíchají. Vakcína může obsahovat jedno nebo více adjuvancií.

Výběr složení vakcíny

Kmeny *E. coli* používané k výrobě vakcíny prokazatelně odpovídají exprimovanými antigeny a vakcína prokazatelně odpovídá svou bezpečností a imunogenitou. Při prokázání bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Exprese antigenů. Exprese antigenů, které podněcují ochrannou imunitní odpověď, se ověří vhodnými imunochemickými metodami (*2.7.1*) na antigenu z každého vakcinačního kmene získaném za podmínek použitých při výrobě vakcíny.

Bezpečnost. Deseti březím prasnicím se podá dvojitá dávka vakcíny. Po intervalu uvedeném v označení na obalu se podá jedna dávka. Zvířata se pozorují až do porodu. Nezjistí se žádné abnormální místní ani systémové reakce, ani se nezjistí vliv na březost a potomstvo.

Bezpečnost se dokazuje v terénních pokusech podáním určené dávky nejméně šedesáti prasnicím ze třech různých chovů a to způsobem a podle schématu uvedeným v označení na obalu. Nejméně třicet prasnic ze stejných chovů tvoří kontrolní skupinu. Prasnice se pozorují 14 dní po poslední dávce. Neprojeví se žádné abnormální místní ani systémové reakce, zejména nedojde ke zvýšení teploty o více než 1,5 °C po dva dny od podání každé dávky vakcíny.

Imunogenita. Vhodnost vakcíny z hlediska imunogenity se může dokázat zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Zkoušky účinnosti šarže

Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti se neprovádí při běžném zkoušení šarží. Provede se jednou nebo několikrát s určitou vakcínou podle rozhodnutí nebo souhlasu oprávněné autority. Tam, kde se zkouška neprovede, použije se alternativní validovaná metoda.

Kritéria pro přijetí se stanoví ve vztahu k šarži, která dává vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti. Následující zkouška se může použít, je-li statisticky prokázána korelace se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Použijí se selata stará nejméně tři týdny a prostá specifických protilátek proti antigenům uvedeným v označení. Každé z pěti selat se vakcinuje způsobem a podle schématu uvedeného v označení. Další dvě selata tvoří nevakcinovanou kontrolu. Jestliže povaha antigenů umožní dosáhnout reprodukovatelných výsledků, může se stanovení provést na laboratorních zvířatech. K dosažení platného stanovení může být nutné provést zkoušku za použití několika skupin zvířat, z nichž každá dostane jinou dávku. Pro každou dávku se provede následující zkouška. Nejméně pět králíků, morčat nebo myší se vakcinuje vhodnou dávkou v jedné injekci. Jako nevakcinované kontroly se použijí nejméně dva králíci, morčata nebo myši. Požaduje-li schéma uvedené v označení další injekci, má se provést doporučené schéma s laboratorními zvířaty, pokud bylo prokázáno, že to bude poskytovat vhodný zkušební systém. V daném intervalu v rozmezí 14 až 21 dní po poslední injekci se všem zvířatům odebere krev a připraví se vzorky séra. K měření protilátkové odpovědi na každý ochranný antigen, který je uveden v označení na obalu, se použije vhodný validovaný test, jako je enzymově imunosorbentové stanovení (ELISA). Hladina protilátek není signifikantně nižší než hladina u šarží, které dávaly vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti a ani se nezjistí signifikantní vzestup titru protilátek u kontrol.

Kde nejsou dostupná séronegativní zvířata, mohou se použít séropozitivní. Při vývoji zkoušky se séropozitivními zvířaty je nutná zvláštní péče při validaci systému, aby bylo stanoveno, že zkouška je vhodně citlivá, a aby se určila kritéria pro splnění, selhání a pro opakování zkoušky. Bude nezbytné vzít v úvahu rozmezí vhodných prevakcinačních titrů a určit ve vztahu k nim přijatelný nejmenší vzestup po vakcinaci.

Zkouška šarže na bakteriální endotoxiny

Zkouška na bakteriální endotoxiny (*2.6.14*) se provádí u hotové šarže nebo, když vlastnosti adjuvancia brání provedení zkoušky, u várky antigenu nebo u směsi várek antigenu bezprostředně před přidáním adjuvancia. Přípravek neobsahuje více než $1 \cdot 10^6$ m.j. endotoxinu v jedné dávce, pokud nebylo prokázáno, že vyšší množství endotoxinu je bezpečné.

Zkouška totožnosti

U zvířat prostých specifických protilátek proti antigenům uvedeným v označení na obalu podněcuje vakcína tvorbu protilátek proti těmto antigenům.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým selatům se každému vstříkne dvojnásobná dávka vakcíny předepsaným způsobem. Za 14 dní se každému zvířeti podá jedna další dávka. Zvířata se pozorují dalších 14 dní. Neprojeví se žádná výrazná místní ani celková reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Stanovení se provede s čelenžním kmenem, který představuje všechny typy antigenů, proti nimž má vakcína chránit. Jestliže není dosažitelný jeden kmen se všemi potřebnými antigeny, opakuje se stanovení s různými čelenžními kmeny.

Použije se osm vnímavých prasniček prostých specifických protilátek proti deklarovaným antigenům. Z nich se namátkově vyberou čtyři, které se v březosti vakcinují dávkou a způsobem uvedeným v označení. Do 12 h po vrhu mláďat, která již dostala kolostrum, se vezme patnáct selat od vakcinovaných zvířat a patnáct selat od nevakcinovaných, nejméně po třech z každého vrhu. Selata se perorálně čelenžují patogenním kmenem *E. coli*, který nesmí být totožný s kmenem použitým k výrobě vakcíny. Pak se selata vrátí jejich matkám. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže nejméně šest selat od kontrolních zvířat uhyne a jestliže nejvýše dvě selata od kontrolních zvířat nemají žádné příznaky nemoci. Vakcína vyhovuje, jestliže nejvýše dvě selata od vakcinovaných zvířat uhynou nebo mají příznaky těžkého onemocnění a nejvýše tři další mají nejdéle tři dny lehký průjem.

Pro některé vakcíny může být nezbytné, aby se čelenž provedla s kmenem, o němž byly uveřejněny údaje, že v experimentálních podmínkách nevyvolává vysokou mortalitu. Za těchto okolností lze zkoušku hodnotit jedině tehdy, jestliže nejméně devět selat od kontrolních zvířat má příznaky těžkého průjmu; vakcína vyhovuje, jestliže nejvýše čtyři selata od vakcinovaných zvířat mají nejdéle tři dny lehký průjem.

Uchovávání

Viz článek *Vakcina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vakcina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede antigen nebo antigeny obsažené ve vakcíně, které podněcují ochrannou imunitní odpověď.

Vaccinum diphtheriae adsorbatum

Adsorbovaná vakcína proti záškrtu

Synonymum. Adsorbovaná očkovací látka proti záškrtu

Je to difterický toxoid adsorbovaný na minerální nosič. Toxoid se připravuje formaldehydovou inaktivací toxinu vytvořeného při růstu kultury mikroba *Corynebacterium diphtheriae.*

Výroba

Várka přečištěného toxoidu

Výchozí kultury, které vytvářejí difterický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Corynebacterium diphtheriae* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Jakmile je to možné, oddělí se asepticky živná půda obsahující toxin od bakteriální masy. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v mililitru), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou pro přípravu várky přečištěného toxinu spojit. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly způsobit u člověka nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se smí použít pouze várka přečištěného toxoidu, který vyhovuje dále uvedeným požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost difterického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně po 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního difterického toxinu, jako je např. inokulace na buněčné kultury nebo intradermální injekce morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající difterickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1500 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství přečištěného toxoidu na hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možno přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní účinnost, a nelze je tedy použít.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze ta konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná ve stati Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkouška totožnosti

Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirý supernatant. Tento supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Pěti zdravým morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, která by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně pětinásobek lidské dávky uvedené v označení. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Volný formaldehyd. Přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (*2.7.6*). Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 30 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce,
- je-li to vhodné, že vakcína je určena pro první očkování dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým,
- název a množství nosiče,
- že vakcína se před použitím roztřepe,
- že vakcína nesmí zmrznout.

Vaccinum diphtheriae adulti et adulescentis adsorbatum

Adsorbovaná vakcína proti záškrtu pro dospělé a dospívající

Je to difterický toxoid adsorbovaný na minerální nosič. Toxoid se připravuje formaldehydovou inaktivací toxinu vytvořeného při růstu kultury mikroba *Corynebacterium diphtheriae.* Oprávněné autoritě se doloží, že množství použitého difterického toxoidu nepůsobí nežádoucí účinky u jedinců věkových skupin, pro které je vakcína určena.

Výroba

Várka přečištěného toxoidu

Výchozí kultury, které vytvářejí difterický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Corynebacterium diphtheriae* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Jakmile je to možné, oddělí se asepticky živná půda obsahující toxin od bakteriální masy. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v mililitru), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou pro přípravu várky přečištěného toxinu spojit. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly způsobit u člověka nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se smí použít pouze várka přečištěného toxoidu, který vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost difterického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně po 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního difterického toxinu, jako je např. inokulace na buněčné kultury nebo intradermální injekce morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající difterickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1500 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství přečištěného toxoidu na hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý; vzniklá směs má být

přibližně izotonická s krví. Je možno přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu, a nelze je tedy použít.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze ta konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkouška totožnosti

Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirý supernatant. Tento supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu. Pokud vakcína adsorbovaná na hydroxid hlinitý nedává uspokojivý výsledek, provede se tato zkouška: 15 ml zkoušeného přípravku se odstředí, sediment se resuspenduje v 5 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *edetanu disodného R* (56 g/l) a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (90 g/l) (1 + 49). Inkubuje se alespoň 6 h při 37 °C a potom se odstředí. Čirý supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Pěti zdravým morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, která by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně pětinásobek lidské dávky uvedené v označení. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Volný formaldehyd. Přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (*2.7.6*). Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 2 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:
- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce,
- název a množství nosiče,
- že vakcína se před použitím roztřepe,
- že vakcína nesmí zmrznout.

Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum

Adsorbovaná vakcína proti záškrtu a tetanu

Synonymum. Adsorbovaná očkovací látka proti záškrtu a tetanu

Je to směs difterického a tetanického toxoidu adsorbovaná na minerální nosič. Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Výroba

Várka přečištěného difterického toxoidu

Výchozí kultury, které vytvářejí difterický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Corynebacterium diphtheriae* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Jakmile je to možné, oddělí se asepticky živná půda obsahující toxin od bakteriální masy. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v mililitru), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou pro přípravu várky přečištěného toxinu spojit. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly způsobit u člověka nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost difterického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně

500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního difterického toxinu, jako je např. inokulace na buněčné kultury nebo intradermální injekce morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající difterickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1500 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Várka přečištěného tetanického toxoidu

Výchozí pracovní kultury, které vytvářejí tetanický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Clostridium tetani* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Asepticky se shromáždí živné půdy obsahující toxin. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v ml), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou spojit, aby se připravila várka přečištěného toxinu. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly u člověka způsobit nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost tetanického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 21 dnů následujících po injekci projeví příznaky tetanu nebo na něj zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního tetanického toxinu, jako je např. vstříknutí myším nebo morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající tetanickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1000 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství přečištěného difterického toxoidu a tetanického toxoidu na hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možno přidat vhodné protimikrobní kon-

zervační látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu, a nelze je tedy použít.

K přípravě šarže se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná ve stati Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkoušky totožnosti

A. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirý supernatant. Tento supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

B. Čirý supernatant získaný ve zkoušce A reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, která by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně pětinásobek lidské dávky uvedené v označení. Jestliže během 42 dnů po injekci kterékoli ze zvířat uhyne za příznaků difterické toxemie nebo tetanu nebo se u něj jejich příznaky projeví, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Volný formaldehyd. Přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Difterická složka. Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (*2.7.6*).

Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 30 m.j. v jedné lidské dávce.

Tetanická složka. Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (*2.7.8*). Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu.

Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 40 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se dále uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce pro každou složku,
- je-li to vhodné, že vakcína je určena pro první očkování dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým,
- název a množství nosiče,
- že vakcína se před použitím roztřepe,
- že vakcína nesmí zmrznout.

Vaccinum diphtheriae et tetani adulti et adulescentis adsorbatum

Adsorbovaná vakcína proti záškrtu a tetanu pro dospělé a dospívající

Je to směs difterického a tetanického toxoidu adsorbovaná na minerální nosič. Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*. Oprávněné autoritě se doloží, že množství použitého difterického toxoidu nepůsobí nežádoucí účinky u jedinců těch věkových skupin, pro které je vakcína určena.

Výroba

Várka přečištěného difterického toxoidu

Výchozí kultury, které vytvářejí difterický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Corynebacterium diphtheriae* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Jakmile je to možné, oddělí se asepticky živná půda obsahující toxin od bakteriální masy. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v mililitru), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou pro přípravu várky přečištěného toxinu spojit. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly způsobit u člověka nežádoucí reakce.

Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost difterického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního difterického toxinu, jako je např. inokulace na buněčné kultury nebo intradermální injekce morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající difterickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1500 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Várka přečištěného tetanického toxoidu

Výchozí pracovní kultury, které vytvářejí tetanický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Clostridium tetani* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Asepticky se shromáždí živné půdy obsahující toxin. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v ml), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou spojit, aby se připravila várka přečištěného toxinu. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly u člověka způsobit nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost tetanického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 21 dnů následujících po injekci projeví příznaky tetanu nebo na něj zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost

aktivního tetanického toxinu, jako je např. vstříknutí myším nebo morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající tetanickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1000 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodných množství přečištěného difterického toxoidu a tetanického toxoidu na hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možno přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu, a nelze je tedy použít.

K přípravě šarže se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná ve stati Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů nádobek. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkoušky totožnosti

A. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirý supernatant. Tento supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu. Pokud vakcína adsorbovaná na hydroxid hlinitý nedává uspokojivý výsledek, proveďte se tato zkouška: 15 ml zkoušeného přípravku se odstředí, sediment se resuspenduje v 5 ml čerstvě připravené směsi objemových dílů roztoku *edetanu disodného R* (56 g/l) a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (90 g/l) (1 + 49). Inkubuje se nejméně 6 h při 37 °C a potom se odstředí. Čirý supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

B. Čirý supernatant získaný ve zkoušce A reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, která by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně pětinásobek lidské dávky uvedené v označení. Jestliže během 42 dnů po injekci kterékoli ze zvířat uhyne za příznaků difterické toxemie nebo tetanu nebo se u něj jejich příznaky projeví, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Volný formaldehyd. Přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Difterická složka. Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (*2.7.6*).

Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 2 m.j. v jedné lidské dávce.

Tetanická složka. Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (*2.7.8*). Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu.

Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 20 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se dále uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce pro každou složku,
- název a množství nosiče,
- že vakcína se před použitím roztřepe,
- že vakcína nesmí zmrznout.

Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis adsorbatum

Smíšená vakcína proti záškrtu, tetanu a dávivému kašli

Synonymum. Smíšená očkovací látka proti záškrtu, tetanu a dávivému kašli

Je to směs difterického a tetanického toxoidu adsorbovaná na minerální nosič a suspenze inaktivovaných mikrobů *Bordetella pertussis*. Toxoidy se připravují formaldehydovou inaktivací toxinů vytvořených při růstu kultur mikrobů *Corynebacterium diphtheriae* a *Clostridium tetani*.

Výroba

Várka přečištěného difterického toxoidu

Výchozí kultury, které vytvářejí difterický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Corynebacterium diphtheriae* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Jakmile je to možné, oddělí se asepticky živná půda obsahující toxin od bakteriální masy. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v mililitru), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou pro přípravu várky přečištěného toxinu spojit. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly způsobit u člověka nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost difterického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 42 dnů následujících po injekci projeví příznaky difterické toxemie nebo na ni zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního difterického toxinu, jako je např. inokulace na buněčné kultury nebo intradermální injekce morčatům. Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající difterickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1500 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Várka přečištěného tetanického toxoidu

Výchozí pracovní kultury, které vytvářejí tetanický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Clostridium tetani* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Asepticky se shromáždí živné půdy obsahující toxin. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v ml), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou spojit, aby se připravila várka přečištěného toxinu. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly u člověka způsobit nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost tetanického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 21 dnů následujících po injekci projeví příznaky tetanu nebo na něj zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního tetanického toxinu, jako je např. vstříknutí myším nebo morčatům.

Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající tetanickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1500 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Suspenze inaktivovaných mikrobů Bordetella pertussis

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Použije se jeden nebo více kmenů mikroba *B. pertussis* známého původu a udržování. Kmeny, živná půda a kultivační metoda se volí tak, aby v hotovém přípravku byly zastoupeny aglutinogeny 1, 2 a 3. Každý kmen se pěstuje 24 h až 72 h v tekuté půdě nebo na pevné půdě; půda použitá při posledním kultivačním stupni neobsahuje krev nebo krevní deriváty. Lidská krev ani krevní deriváty z ní připravené se v živných půdách nepoužijí. Bakterie se sklidí, promytím se odstraní příměsi pocházející z živné půdy a bakterie se suspendují v roztoku chloridu sodného (9 g/l) nebo v jiném vhodném izotonickém roztoku. Denzita suspenze se stanoví nejpozději dva týdny po sklizení porovnáním s mezinárodním referenčním preparátem denzity a takto získaná hodnota se použije jako základ pro výpočet v následujících krocích při přípravě vakcíny. Hodnotu mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Jednotlivé sklizně se nepoužijí pro konečnou várku vakcíny, pokud nebylo prokázáno, že obsahují buňky *B. pertussis* se stejnými vlastnostmi, pokud jde o růst a aglutinogeny, jako původní kmen a že nejsou kontaminovány bakteriemi a houbami. Bakterie se usmrtí a detoxikují za kontrolovaných podmínek buď vhodnou chemickou látkou, nebo teplem, nebo kombinací těchto dvou metod. Nepřítomnost živých mikrobů *B. pertussis* se zkouší za použití vhodné živné půdy. Suspenze se uchovává po vhodnou dobu při (5 ± 3) °C, aby se snížila její toxicita.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství přečištěného difterického toxoidu a přečištěného tetanického toxoidu na hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý a přidáním vhodného množství suspenze inaktivovaných mikrobů *B. pertussis;* vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Koncentrace mikrobů *B. pertussis* v konečné várce vakcíny nepřesahuje koncentraci odpovídající denzitě 20 m.j. na jednu lidskou dávku. Pokud se použijí dva nebo více kmenů *B. pertussis*, je složení po sobě jdoucích šarží vycházejících z konečné várky vakcíny stejné, pokud jde o zastoupení každého kmene, vyjádřené v jednotkách denzity. K várce vakcíny je možno přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu a nelze je tedy použít.

K výrobě šarže přípravku se použije pouze ta konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provedou se zkoušky popsané v odstavci Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkoušky totožnosti

A. Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirý supernatant; sediment se uchová pro zkoušku C. Tento supernatant reaguje s vhodným difterickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

B. Čirý supernatant získaný ve zkoušce A reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

C. Totožnost pertussové složky se prokáže aglutinací bakterií v resuspendovaném sedimentu po odstředění (viz zkoušku totožnosti A; je možno použít i jiné vhodné metody oddělení bakterií od nosiče) specifickým sérem proti *B. pertussis* nebo zkouškou popsanou ve stati Stanovení účinnosti.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost.

Difterická a tetanická složka. Pěti zdravým morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, která by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně pětinásobek lidské dávky uvedené v označení. Jestliže během 42 dnů po injekci kterékoli ze zvířat uhyne za příznaků difterické toxemie nebo tetanu nebo se u něj jejich příznaky projeví, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Pertussová složka. Nejméně deset zdravých myší o hmotnosti 14 g až 16 g se použije pro skupinu zkoušenou i kontrolní. Myši musí být stejného pohlaví nebo musí být obě pohlaví ve skupinách rovnoměrně zastoupena. Zvířata musí mít přístup k potravě a vodě po celou zkoušku a nejméně 2 h před jejím začátkem. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml tak, aby dávka obsahovala množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se vstříkne 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího, pokud možno, stejné množství protimikrobní konzervační látky, které bylo podáno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak 72 h a 7 dní po podání. Vakcína vyhovuje požadavkům zkoušky jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost skupiny očkovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek hmotnosti očkovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti myší kontrolních a c) během zkoušky uhyne nejvýše 5 % očkovaných myší.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Volný formaldehyd. Přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Difterická složka. Provede se jedno s předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu (*2.7.6*).

Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 30 m.j. v jedné lidské dávce.

Tetanická složka. Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (*2.7.8*). Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu.

Provádí-li se zkouška na morčatech, je dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti nejméně 40 m.j. v jedné lidské dávce, u zkoušky na myších nejméně 60 m.j. v jedné lidské dávce.

Pertussová složka. Provede se Stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (*2.7.7*).

Stanovená účinnost je nejméně 4 m.j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 2 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce pro každou složku,
- je-li to vhodné, že vakcína je určena pro první očkování dětí a není nutně vhodná pro podpůrné dávky nebo pro podávání dospělým,
- název a množství nosiče,
- že vakcína se před použitím roztřepe,
- že vakcína nesmí zmrznout.

Vaccinum encephalomyelitidis infectivae aviariae vivum

Živá vakcína proti infekční ptačí encefalomyelitidě

Je to přípravek z imunogenního kmene viru infekční encefalomyelitidy ptáků.

Výroba

Kmen viru se pomnožuje ve žloutkovém vaku kuřecích embryí z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Jsou-li buněčné kultury ptačího původu, získávají se z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Suspenze viru se sklidí a smíchá s vhodnou stabilizující tekutinou. Vakcína může být lyofilizovaná nebo tekutá.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu vakcíny se může použít pouze takový virový kmen, který je prokazatelně uspokojivý z hlediska imunogenity a s omezenou patogenitou.

Při prokazování bezpečnosti se může použít následující zkouška (*5.2.6*).

Omezená patogenita. Vstříkne-li se jednodenním kuřatům z chovu prostého specifikovaných patogenů intracerebrálně dávka 100 EID_{50}, nezpůsobí žádné příznaky infekční ptačí encefalomyelitidy dříve než devátý den po injekci.

Zkoušení šarže

Pokud byly zkoušky na viry ptačí leukózy a na cizí viry na buněčných kulturách a na kuřecích embryích provedeny s uspokojivými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, mohou být tyto zkoušky při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěny, jestliže k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s uspokojivým výsledkem na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, jestliže k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Vakcína, je-li třeba rekonstituovaná, se vstříkne do žloutkového vaku vnímavých pětidenních až šestidenních kuřecích embryí. Vylíhlá kuřata se pozorují 10 dní. Vykazují nervové příznaky charakteristické pro infekční ptačí encefalomyelitidu.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použije se nejméně deset kuřat starých 3 týdny z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Každému z kuřat se orálně podá deset dávek vakcíny rekonstituované tak, aby byla získána vhodná koncentrace pro zkoušku. Kuřata se pozorují 21 dní. Jestliže v době pozorování uhynou více než dvě kuřata z příčin, které nelze přisoudit vakcíně, zkouška se opakuje. Vakcína vyhovuje, jestliže se u žádného z kuřat nevyvinou příznaky nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*). Vakcína, je-li třeba rozpuštěná, vyhovuje po neutralizaci zkoušce na leukózní viry. Jestliže není možné neutralizovat vakcinační virus, provede se jiná vhodná zkouška.

Důkaz cizích virů zkouškou na buněčných kulturách (*2.6.5*). Zkoušený přípravek, co nejvíce neutralizovaný, vyhovuje zkoušce na cizí viry provedené na buněčných kulturách.

Důkaz cizích virů zkouškou na kuřecích embryích (*2.6.3*). Zkoušený přípravek, co nejvíce neutralizovaný, vyhovuje zkoušce na cizí viry provedené na kuřecích embryích.

Důkaz cizích agens zkouškou na kuřatech (*2.6.6*). Vakcína, je-li třeba rozpuštěná, vyhovuje zkoušce na cizí agens. V této zkoušce se použijí kuřata stará 3 týdny.

Bakterie a houby. Provede se kvantitativní zkouška na bakterie a houby. Vakcína neobsahuje více než jeden saprofytický mikroorganismus na dávku a je prosta patogenních mikroorganismů. Každá

tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Přípravek se titruje v buněčných kulturách nebo inokulací do žloutkového vaku kuřecích embryí starých 5 až 6 dnů. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá nejnižšímu deklarovanému titru.

Stanovení účinnosti

Použijí se vnímavá kuřata z jednoho chovu prostého specifikovaných patogenů, stará tři týdny (*5.2.2*). Jestliže se doporučuje očkování celého hejna, podá se každému z nejméně dvaceti kuřat pro každý z uvedených způsobů podání takový objem rozpuštěné vakcíny, který obsahuje množství viru, jež odpovídá nejnižšímu deklarovanému titru. Jestliže se doporučuje vakcinace jen části hejna, podá se každému z pěti kuřat pro každý z udávaných způsobů podání objem vakcíny obsahující množství viru, jež odpovídá nejnižšímu deklarovanému titru a jako kontaktní kontrola se zařadí nejméně padesát kuřat. V obou případech se pro kontrolu použije dvacet kuřat. Za 28 dní se intracerebrálně čelenžují všechna kuřata očkovaných skupin i kontrolní skupiny a nejméně dvacet náhodně vybraných kuřat ze skupiny kontaktních kontrol vhodným množstvím virulentního viru ptačí encefalomyelitidy. Kuřata se pozorují 21 dní. Přípravek vyhovuje, jestliže na konci období pozorování nejméně 80 % kuřat očkovaných přímo nebo kontaktem přežívá a nejeví příznaky onemocnění a nejméně 70 % kontrolních kuřat uhyne nebo vykazuje příznaky onemocnění.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede:

- stáří zvířat, ve kterém mají být očkována,
- že tekutá vakcína se má použít bezprostředně po vyjmutí z chladničky.

Vaccinum erysipelatis suillae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti července prasat

Synonymum. Inaktivovaná očkovací látka proti července prasat

Je to suspenze jednoho nebo více vhodných inaktivovaných kmenů *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E. insidiosa*).

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.* Kmeny *E. rhusiopathiae*, jejichž imunogenita byla zkontrolována na prasatech, se pomnoží na vhodných živných půdách. Po vhodné době kultivace

se bakterie zcela inaktivují fyzikálními nebo chemickými prostředky nebo jejich kombinací; může se přidat adjuvans.

Zkouška totožnosti

Přípravek chrání vnímavá zvířata proti infekci vyvolané *E. rhusiopathiae.*

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost.

A. Dvěma zdravým a vnímavým prasatům ve věku 3 až 4 měsíce se vstříkne způsobem uvedeným v označení po dvojnásobku dávky zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují nejméně 10 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

B. Deseti zdravým myším hmotnosti 17 g až 20 g se podkožně vstříkne po 0,5 ml zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují nejméně 10 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší proti smrtící dávce virulentní kultury *E. rhusiopathiae* s dávkou referenčního přípravku potřebnou k zajištění stejné ochrany. Biologické stanovení vyžaduje použití referenčního přípravku kalibrovaného v mezinárodních jednotkách a vhodné kultury *E. rhusiopathiae*, určené k přípravě čelenžní dávky. Mezinárodní jednotka je specifická účinnost obsažená v určitém množství mezinárodního standardu, který pozůstává z definovaného množství lyofilizované vakcíny proti července prasat. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Ke zkoušce se použijí zdravé bílé myši z jednotného chovu a hmotnosti 17 g až 20 g. Rozdělí se nejméně do šesti skupin po šestnácti zvířatech. Nejméně třem skupinám myší se podá referenční přípravek a nejméně třem skupinám zkoušený přípravek. Skupina deseti myší slouží jako kontrola čelenžního kmene.

K čelenži se použije dostatečné množství virulentní kultury v růstové fázi vhodného kmene *E. rhusiopathiae* nebo takové ředění, aby se získala dávka, která usmrtí myši ve lhůtě dvou až pěti dní.

Pomocí roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se připraví nejméně tři ředění referenčního přípravku a nejméně tři ředění zkoušeného přípravku tak, aby v každé skupině byla dávka chránící asi 50 % myší co možná nejblíže střední hodnotě v řadě. Je vhodné např. použít dávky obsahující v 0,5 ml 0,2 m.j., 1,0 m.j. a 5,0 m.j. jak pro referenční, tak i pro zkoušený přípravek. Každé myši se podkožně vstříkne příslušné ředění a za 21 dní se všechny myši, včetně myší z kontrolní skupiny, intraperitoneálně čelenžují. Myši se pozorují 8 dní a zaznamenávají se počty uhynulých. Účinnost zkoušeného přípravku ve srovnání s referenčním přípravkem se vypočítá obvyklými statistickými metodami.

Přípravek obsahuje stanovení účinnosti, jestliže dolní mez spolehlivosti (P = 0,95) zjištěné účinnosti není nižší než 50 m.j. v dávce pro prase.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení obalu se uvedou sérologické typy, proti nimž je přípravek účinný, pokud to požaduje oprávněná autorita.

Vaccinum febris flavae vivum

Živá vakcína proti žluté zimnici

Je to lyofilizovaný přípravek kmene 17D viru žluté zimnice (*Flavivirus hominis*), pomnoženého v kuřecích embryích. Vakcína se rozpustí bezprostředně před použitím předepsaným způsobem na čirou tekutinu.

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní metoda prokazatelně poskytuje stejnorodou živou vakcínu proti žluté zimnici s přijatelnou imunogenitou a bezpečností pro člověka. Výrobní metoda se validuje, aby se prokázalo, že bude-li přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost pro imunní séra a vakcíny pro humánní použití (*2.6.9*) s následující úpravou zkoušky na morčatech: každému morčeti se vstříkne deset lidských dávek a pozorují se 21 dní.

Substrát pro kultivaci viru

Virus pro přípravu matečného a pracovního inokula a všech šarží vakcíny se pomnožuje v tkáních kuřecích embryí z chovu kuřat prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*).

Inokula

Kmen 17D je určen podle původních záznamů, které obsahují informaci o původu kmene a následné manipulaci s ním. Inokula viru se připravují ve velkých množstvích a uchovávají se při teplotě pod -60 °C. Matečné a pracovní inokulum neobsahují žádnou lidskou bílkovinu ani přidané sérum.

Není-li jinak vysvětleno a schváleno, virus v konečné vakcíně je na úrovni 204. až 239. pasáže z původně izolovaného kmene 17D. Pracovní inokulum je pouze jedinou pasáží z matečného inokula. Pracovní inokulum se použije bez zprostředkující pasáže jako inokulum pro infikování tkání použitých k výrobě šarže vakcíny, aby bylo zajištěno, že vakcína byla vyrobena pouze jedinou pasáží z matečného inokula, které vyhovělo všem zkouškám na bezpečnost.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k pomnožení viru.

Zkouška totožnosti. V matečném a pracovním inokulu se virus žluté zimnice prokáže neutralizací sérem v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Cizí agens (*2.6.16*). Každé pracovní inokulum vyhovuje následujícím zkouškám:

Bakterie a houby - sterilita

Mykoplazmata

Mykobakterie
Ptačí viry
Zkouška na dospělých myších (pouze intraperitoneální inokulace)
Zkouška na morčatech

Zkouška na opicích. Každé matečné a pracovní inokulum vyhovuje následujícím zkouškám na opicích na viremii (viscerotropismus), imunogenitu a neurotropismus.

Používají se opice druhu *Macaca* citlivé na virus žluté zimnice, které v době podání virové kultury nejsou prokazatelně imunní vůči žluté zimnici, jsou zdravé a nebyly dříve intracerebrálně nebo intraspinálně očkovány. Mimo to nebyly očkovány jinými způsoby neurotropními viry nebo antigeny příbuznými viru žluté zimnice. Pro každou zkoušku se použije nejméně deset opic.

Použije se zkušební dávka 0,25 ml obsahující množství odpovídající nejméně 5000 myších LD_{50} a nejvýše 50 000 myších LD_{50}, stanovená titrací infekčního viru a za použití stanoveného vztahu mezi koncentrací viru a myší LD_{50} (viz Stanovení účinnosti). Zkušební dávka se pod anestezií vstříkne každé opici do frontálního laloku a opice se pozorují nejméně 30 dní.

Viremie (viscerotropismus). Viscerotropismus je určen množstvím viru obsaženého v séru. Druhý, čtvrtý a šestý den po inokulaci se každé zkoušené opici odebere krev a z každého vzorku se připraví sérum. Z každého séra se připraví ředění 1 : 10, 1 : 100 a 1 : 1000 a každé ředění se naočkuje do skupiny nejméně šesti nádob s buněčnou kulturou používanou ke stanovení virové koncentrace. Inokulum vyhovuje zkoušce, jestliže žádné sérum neobsahuje více než ekvivalent 500 myších LD_{50} v 0,03 ml a nejvýše jedno sérum obsahuje více než ekvivalent 100 myších LD_{50} v 0,03 ml.

Imunogenita. Za 30 dní od podání zkušební dávky se každé opici odebere krev a z každého vzorku se připraví sérum. Inokulum vyhovuje zkoušce, jestliže se nejméně 90 % zkoušených opic ukáže jako imunní, což se stanoví vyšetřením jejich séra v dále popsané zkoušce na neutralizaci viru žluté zimnice.

Ukázalo se, že malé ředění séra (např. 1 : 10) může obsahovat nespecifické inhibitory, které ovlivňují tuto zkoušku; takové sérum se upraví, aby se inhibitory odstranily. Ředění séra nejméně 1 : 10, 1 : 40 a 1 : 160 od každé opice se smíchají se stejným objemem kultury vakcinačního viru 17D na ředění, které poskytne nejvhodnější počet plaků při použité titrační metodě. Směsi séra s virem se 1 h inkubují ve vodní lázni při 37 °C a pak se ochladí ve vodě s ledem; po 0,2 ml směsi séra s virem se dá na čtyři misky s buněčnou kulturou a postupuje se jako při stanovení koncentrace viru. Podobně se naočkuje deset misek stejným množstvím virové kultury smíchané se stejným objemem zředěného 1 : 10 séra, o němž se ví, že neobsahuje žádné neutralizující protilátky proti viru žluté zimnice. Na konci pozorovací doby se porovná průměrný počet plaků na miskách obsahujících virovou kulturu a neimunní sérum s průměrným počtem plaků na miskách obsahujících virovou kulturu a jednotlivá ředění každého opičího séra. Nejvýše 10 % zkoušených opic má sérum, které při ředění 1 : 10 nestačí snížit počet plaků o 50 %.

Neurotropismus. Neurotropismus (jak se uvádí při výskytu klinicky projevené encefalitidy a při stupni mortality) se stanoví následovně. Opice se denně vyšetřují personálem dobře seznámeným s klinickými příznaky encefalitidy u primátů (je-li třeba, opice se vyjmou z klecí, aby se zjistily známky motorické slabosti nebo křečí). U nejvýše 10 % zkoušených opic se rozvinou vážné příznaky encefalitidy (takové jako neúplná paralýza, nekoordinované třesy, letargie, neschopnost se spontánně postavit, motorická slabost nebo křeče) s frekvencí větší než příznaky vyvolané laboratorní referenční vakcínou, která má přijatelné vlastnosti u člověka a opic. Ani začátek a trvání febrilních reakcí, ani podstata příznaků a patologických nálezů nejsou takové, aby indikovaly změnu ve vlastnostech viru.

Pomnožování viru a sklizeň

Všechny práce s kuřecími embryi se provádějí v aseptických podmínkách v prostoru, kde se ve stejnou dobu nepracuje s jiným infekčním agens, ani s jinými buňkami. Dvě procenta, ale nejméně dvacet embryí a nejvýše padesát embryí se odloží stranou jako neinfikovaná kontrola embryí. Po inokulaci a inkubaci v kontrolované teplotě se sklízí jen živá a typická embrya. Stáří embrya v době sklizně viru se odhadne z původního vložení vajec do inkubátoru a mělo by být nejvýše 12 dní. Po homogenizaci a vyčeření odstředěním se výtažek z embryonální dřeně zkouší, jak je popsáno dále, a do dalšího zpracování se uchovává při -70 °C nebo nižší teplotě. Virové sklizně, které vyhoví zkouškám, se mohou smíchat. K virové suspenzi se v žádném stupni v průběhu výroby nepřidává žádná lidská bílkovina. Pokud se přidávají stabilizátory, pak prokazatelně nemají na člověka žádné antigenní ani senzibilizující působení.

Pouze jednotlivá sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

Zkouška totožnosti. Virová sklizeň obsahuje virus, který se dokáže sérovou neutralizací v buněčné kultuře při použití specifických protilátek jako virus žluté zimnice.

Cizí agens (*2.6.16*). Výtažek z embryonální dřeně, který tvoří jednotlivou sklizeň, vyhovuje následujícím zkouškám:

Bakterie a houby - sterilita
Mykoplazmata
Kontrolní vejce

Koncentrace viru. Aby se mohlo vypočítat ředění pro konečnou várku vakcíny, zkouší se každá sklizeň na koncentraci viru způsobem popsaným v odstavci Stanovení obsahu.

Konečná várka vakcíny

Sklizně viru, které vyhovují shora předepsaným zkouškám, se spojí a znovu čeří. Provede se stanovení bílkovinného dusíku. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se vhodně zředí.

Pouze taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*), na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Obsah bílkovinného dusíku. Obsah bílkovinného dusíku před přidáním stabilizátoru je nejvýše 0,25 mg v lidské dávce.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, která je prokazatelně vhodná pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje z hlediska tepelné stability a všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška na ovalbumin provedena s uspokojivými výsledky na konečné várce vakcíny, může být u šarže vypuštěna.

Tepelná stabilita. Vzorky šarže lyofilizované vakcíny se inkubují v suchém stavu 14 dní při 37 °C. V inkubované i neinkubované vakcíně se souběžně stanoví koncentrace viru, jak je uvedeno v odstavci Stanovení obsahu. Rozdíl v koncentraci viru mezi inkubovanou a neinkubovanou vakcínou nepřesáhne 1,0 $\log_{10}$ a koncentrace viru v lidské dávce inkubované vakcíny je nejméně počet jednotek tvořících plaky (PFU), odpovídající $1 \cdot 10^3$ myších LD_{50}.

Zkouška totožnosti

Když se vakcína rekonstituuje podle návodu a smíchá se specifickými protilátkami proti viru žluté zimnice, dojde k signifikantnímu snížení její schopnosti infikovat vnímavé buněčné kultury.

Zkoušky na čistotu

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Ovalbumin. Nejvýše 5 μg ovalbuminu v lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 5 m.j. bakteriálního endotoxinu v lidské dávce.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení obsahu

Infekční virus se titruje v buněčných kulturách. K validaci každého stanovení se použije vhodný virový referenční přípravek.

Koncentrace viru je nejméně ekvivalent v PFU $1 \cdot 10^3$ myších LD_{50} v lidské dávce. Vztah mezi myší LD_{50} a PFU si stanoví každá laboratoř a schválí jej oprávněná autorita.

Ke stanovení myší LD_{50} se může použít dále uvedená metoda nebo jiný vhodný postup.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede:
- kmen viru použitý v přípravku,
- že je vakcína připravena z kuřecích embryí,
- minimální koncentrace viru,
- že se má vyhnout styku s dezinfekčními prostředky,
- časový úsek, v němž se má vakcína použít po rekonstituci.

Navržená metoda ke stanovení myší LD_{50}

Myší LD_{50}. Je to statisticky vypočítané množství virové suspenze, u něhož se očekává vyvolání fatální specifické encefalitidy u 50 % myší vysoce vnímavého kmene, 4 až 6 týdnů starých, po intracerebrální inokulaci.

Připraví se vhodné sériové ředění rekonstituované vakcíny v rozpouštědle pro virus žluté zimnice, jako je např. roztok *bovinního albuminu R* (7,5 g/l) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným o pH 7,4* nebo jiné rozpouštědlo, které prokazatelně odpovídá udržením infekčnosti viru.

Myším vysoce vnímavého kmene, 4 až 6 týdnů starým, se intracerebrálně vstříkne při anestezii 0,03 ml ředění vakcíny. Pro každé ředění se použije skupina o nejméně šesti myších; série ředění se zvolí tak, aby zasahovala od 0 % do 100 % myší mortality. Myši se naočkují ihned po přípravě ředění a pozorují se 21 dní. Všechny úhyny se zaznamenávají. Do výpočtu se zahrnují jenom přežívající myši a úhyny způsobené typickou infekcí žlutou zimnicí. Myši paralyzované dvacátý první den pozorování se počítají jako přežívající.

Vaccinum febris typhoidis

Vakcína proti tyfu

Je to sterilní suspenze inaktivovaných mikrobů *Salmonella typhi* obsahující nejméně $5 \cdot 10^8$ a nejvýše $1 \cdot 10^9$ bakterií (*S. typhi*) v lidské dávce. Lidská dávka nepřesahuje 1 ml.

Výroba

Připravuje se systémem jednotné inokulace z vhodného kmene *S. typhi*, jako např. Ty 2[4]. Hotový přípravek představuje nejvýše tři subkultury kmene, u kterého byly provedeny laboratorní a klinické zkoušky prokazující jeho vhodnost. Bakterie se inaktivují acetonem, formaldehydem, fenolem nebo teplem, případně kombinací posledních dvou metod.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*): vstříkne se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

Zkouška totožnosti

Totožnost se prokazuje specifickou aglutinací.

Zkoušky na čistotu

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 5 g/l, pokud byl použit při výrobě přípravku.

Antigenní schopnost. Je-li vakcína podána vnímavým laboratorním zvířatům, vyvolá vznik anti-O, anti-H a v menší míře i anti-Vi aglutininů.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- metoda použitá k inaktivaci bakterií,
- počet bakterií v lidské dávce.

---

[4] Tento kmen je poskytován Střediskem pro spolupráci při standardizaci a výzkumu bakteriálních vakcín Světové zdravotnické organizace, Ústav lidských sér a očkovacích látek, Szallas Utca 5, H - 1107, Budapešť, Maďarsko.

Vaccinum febris typhoidis cryodessicatum

Lyofilizovaná vakcína proti tyfu

Je to lyofilizovaný přípravek inaktivovaných mikrobů *Salmonella typhi*. Rekonstituuje se předepsaným způsobem tak, aby vznikla stejnorodá suspenze obsahující nejméně $5 \cdot 10^8$ a nejvýše $1 \cdot 10^9$ bakterií (*S. typhi*) v lidské dávce. Lidská dávka nepřesahuje 1,0 ml rekonstituované vakcíny.

Výroba

Připravuje se systémem jednotné inokulace z vhodného kmene *S. typhi*, jako např. Ty 2[5]. Hotový přípravek představuje nejvýše tři subkultury kmene, u kterého byly provedeny laboratorní a klinické zkoušky prokazující jeho vhodnost. Bakterie se inaktivují acetonem nebo formaldehydem nebo teplem; fenol se v přípravku nepoužívá. Plní se do sterilních obalů a lyofilizuje se do dosažení obsahu vlhkosti vhodného pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se vyloučila kontaminace.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví takto upravené zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*): vstříkne se 0,5 ml vakcíny každé myši a 1,0 ml každému morčeti.

Zkouška totožnosti

Totožnost přípravku rekonstituovaného podle návodu se prokazuje specifickou aglutinací.

Zkoušky na čistotu

Rekonstituovaný přípravek vyhovuje těmto zkouškám:

Antigenní schopnost. Je-li vakcína podána vnímavým laboratorním zvířatům, vyvolá vznik anti-O, anti-H a v menší míře i anti-Vi aglutininů.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- metoda použitá k inaktivaci bakterií,
- počet bakterií v jedné lidské dávce,
- že se vakcína použije do 8 h po rekonstituci.

---

[5] Tento kmen je poskytován Střediskem pro spolupráci při standardizaci a výzkumu bakteriálních vakcín Světové zdravotnické organizace, Ústav lidských sér a očkovacích látek, Szallas Utca 5, H - 1107, Budapešť, Maďarsko.

Vaccinum febris typhoidis polysaccharidicum

Polysacharidová vakcína proti tyfu

Je to přípravek z purifikovaného Vi kapsulárního polysacharidu *Salmonella typhi* kmene Ty2 nebo jiného vhodného kmene, který má schopnost vytvářet Vi polysacharid.

Kapsulární Vi polysacharid sestává z částečně 3-O-acetylovaných opakujících se jednotek 2-acetylamino-2-deoxy-D-galaktopyranuronové kyseliny s -(1→4) řetězci.

Výroba

Výroba Vi polysacharidu je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup prokazatelně poskytuje stejnorodé tyfové polysacharidové vakcíny přiměřené svojí imunogenitou a bezpečností pro člověka.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že přípravek, bude-li zkoušen, vyhoví ve zkoušce na neškodnost pro imunní séra a vakcíny pro humánní použití *(2.6.9)*.

Bakteriální inokula

Kmen *S. typhi* použitý jako matečné inokulum je určen podle průvodních záznamů, které zahrnují informace o jeho původu a biochemické a sérologické charakteristiky. Kultury pracovního inokula vykazují tytéž charakteristiky jako kmen, který byl použit k přípravě matečného inokula.

Pouze kmen, který má následující charakteristiky, se může použít pro přípravu vakcíny: a) barvené nátěry z kultury jsou typické pro enterobakterie; b) kultury zužitkovávají glukosu bez tvorby plynu; c) kolonie na agaru jsou oxidasa-negativní; d) suspenze z kultur se specificky aglutinují s vhodným Vi antisérem nebo kolonie na agarové plotně obsahující vhodné Vi antisérum tvoří prstence.

Kultivace a sklizeň

Pracovní inokulum se kultivuje na pevné půdě, která může obsahovat substance krevních skupin, nebo v tekuté půdě; získané inokulum se přenese do tekuté živné půdy, která se použije k naočkování konečné živné půdy.

Použitá tekutá půda a konečná živná půda jsou semisyntetické, prosté látek, které se srážejí cetrimoniumbromidem a neobsahují krevní skupinové substance ani vysokomolekulární polysacharidy, pokud není prokázáno jejich odstranění purifikačním procesem.

Bakteriální čistota kultury se ověří mikroskopickým vyšetřením nátěru obarveného podle Grama a vyočkováním na vhodné živné půdy; několik polí se pozoruje při velkém zvětšení tak, aby se vyšetřilo nejméně 10 000 organismů. Kultura se pak na začátku stacionární fáze inaktivuje přidáním formaldehydu. Bakteriální buňky se odstraní odstředěním; polysacharid se z média precipituje přidáním hexadecyltrimethylamoniumbromidu (cetrimoniumbromid). Precipitát se sklidí a může se před purifikací uchovávat při -20 °C.

Purifikovaný Vi polysacharid

Po rozštěpení polysacharid/cetrimoniumbromidového komplexu se polysacharid purifikuje za použití vhodných postupů k odstranění zbylých nukleových kyselin, bílkovin a lipopolysacharidů. Polysacharidy se srážejí jako vápenatá sůl v přítomnosti ethanolu a suší se při 2 °C až 8 °C; získaný prášek tvoří Vi polysacharid. Ztráta sušením se stanoví termogravimetricky *(2.2.34)* a získaná hodnota se použije k přepočtu výsledků dále uvedených chemických zkoušek na vysušenou látku.

Pouze purifikovaný Vi polysacharid , který vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

Bílkovina (*2.5.16*). Nejvýše 10 mg v 1 g polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

Nukleové kyseliny *(2.5.17)*. Nejvýše 20 mg v 1 g polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

O-Acetyl skupiny *(2.5.19)*. Nejméně 2 mmol v 1 g polysacharidu, počítáno na vysušenou látku.

Molekulová velikost. Provede se vylučovací chromatografie *(2.2.30)* s použitím *agarosy síťované pro chromatografii R*. Použije se kolona délky 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm, jejíž rovnováha byla ustavena rozpouštědlem s iontovou silou 0,2 mol/kg a hodnotou pH 7,0 až 7,5. Na kolonu se nanese asi 5 mg polysacharidu v objemu 1 ml a eluuje se asi 20 ml/h. Odebírají se frakce asi po 2,5 ml. Stanoví se bod odpovídající $K_D = 0{,}25$ a udělají se dvě směsi sestávající z frakcí eluovaných před a po tomto bodě. Stanoví se O-acetyl skupiny v těchto dvou směsích *(2.5.19)*. Ve směsi obsahující frakce eluované před bodem $K_D = 0{,}25$ je nalezeno nejméně 50 % polysacharidu.

Zkouška totožnosti. Provede se zkouška totožnosti za použití vhodné imunochemické metody *(2.7.1)*.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 150 m.j. endotoxinu v mikrogramu polysacharidu.

Konečná várka vakcíny

Jedna nebo více šarží purifikovaného Vi polysacharidu se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, které může obsahovat protimikrobní konzervační látku tak, aby objem odpovídající jedné dávce obsahoval 25 µg polysacharidu a roztok byl izotonický s krví (od 250 mosm/kg do 350 mosm/kg).

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím zkouškám, se může použít pro výrobu šarže.

Sterilita *(2.6.1)*. Konečná várka vakcíny vyhovuje ve zkoušce na sterilitu, na každou půdu se použije 10 ml.

Protimikrobní konzervační látky. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou fyzikálně-chemickou metodou. Zjistí se 85 % až 115 % zamýšleného množství.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů, které se potom uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům předepsaným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu může být uvolněna k použití. Pokud byly zkoušky na volný formaldehyd a protimikrobní konzervační látky provedeny v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá tekutina, prostá viditelných částic.

Zkouška totožnosti

Provede se zkouška totožnosti použitím vhodné imunochemické metody *(2.7.1)*.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,5 až 7,5.

O-Acetyl skupiny. 0,085 (± 25 %) µmol v dávce (25 µg polysacharidu).

Zkoušený roztok. Do každé ze tří zkumavek se dá po 3 ml vakcíny (dva reakční roztoky a jeden korekční roztok).

Porovnávací roztoky. 0,150 g *acetylcholiniumchloridu R* se rozpustí v 10 ml *vody R* (základní roztok obsahující 15 g/l acetylcholiniumchloridu). Bezprostředně před použitím se 0,5 ml základního roztoku zředí *vodou R* na 50 ml (pracovní ředění obsahující 150 µg /ml acetylcholinium chloridu). Do deseti zkumavek se ve dvojicích (reakční a korekční roztok) rozplní 0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml a 1,5 ml pracovního ředění. Slepá zkouška se připraví ze 3 ml *vody R*.

Objem v každé zkumavce se doplní *vodou R* na 3 ml. Přidá se 0,5 ml směsi objemových dílů *vody R*, *kyseliny chlorovodíkové zředěné R* (1 + 2) do každé korekční zkumavky a ke slepé zkoušce. Do každé zkumavky se se přidá 1,0 ml *hydroxylamoniumchloridu alkalického RS*. Reakce se nechá probíhat přesně 2 min a do každé z reakčních zkumavek se přidá 0,5 ml směsi objemových dílů *vody R* a *kyseliny chlorovodíkové zředěné R* (1 + 2). Do každé zkumavky se přidá 0,5 ml roztoku *chloridu železitého R* (200 g/l) v *kyselině chlorovodíkové 2 mol/l RS*, zkumavky se zazátkují a silně se protřepají k odstranění bublin.

Měří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm s použitím slepé zkoušky jako kompenzačního roztoku. Pro každý reakční roztok se odečte absorbance příslušného korekčního roztoku. Sestrojí se kalibrační křivka z absorbancí pěti porovnávacích roztoků a odpovídajících obsahů acetylcholiniumchloridu. Z křivky se odečte obsah acetylcholiniumchloridu ve zkoušených roztocích pro každý zkoušený objem. Vypočítá se průměr ze dvou hodnot.

1 mol acetylcholiniumchloridu (181,7 g) odpovídá 1 mol O-acetylu (43,05 g).

Volný formaldehyd. Vyhovuje zkoušce na volný formaldehyd předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobních konzervačních látek vhodnou fyzikálně-chemickou metodou. Obsah je nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud byl při přípravě použit fenol, nepřesahuje jeho množství 2,5 g/l *(2.5.15)*.

Sterilita *(2.6.1)*. Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 3750 m.j. endotoxinu v jednotlivé lidské dávce.

Stanovení obsahu

Vi polysacharid se stanoví vhodnou imunochemickou metodou *(2.7.1)* s použitím referenčního purifikovaného polysacharidu. Stanovené množství polysacharidu v dávce je 80 % až 120 % deklarovaného množství. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanoveného obsahu je v rozmezí 80 % až 120 %.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obale se uvede:

- počet mikrogramů polysacharidu v lidské dávce (25 µg),
- celkové množství polysacharidu v obalu.

Vaccinum febris typhoidis vivum perorale (stirpe Ty 21a)

Živá perorální vakcína proti tyfu (kmen Ty 21a)

Je to lyofilizovaný přípravek živého mikroba *Salmonella typhi* kmene Ty 21a, vypěstovaného ve vhodné živné půdě. Pokud je vakcína podávána v tobolkách, vyhovuje požadavkům článku Capsulae.

Výroba

Výběr vakcinačního kmene

Hlavní charakteristikou kmene je nedostatek enzymu uridin difosfat-galaktosa-4-epimerasy. Aktivita galaktopermeasy, galaktokinasy a galaktosa-1-fosfat uridyl-transferasy jsou sníženy o 50 % až 90 %. Kmen neobsahuje Vi antigen, i když jsou růstové podmínky jakékoli. Sérum anti-O:9 aglutinuje kmen pouze tehdy, pěstuje-li se na půdě s obsahem galaktosy. Obsahuje bičíkový H:d antigen a netvoří sirovodík na Kliglerově agaru s obsahem železa. Kmen není virulentní pro myši. Buňky kmene Ty 21a lyzují, pokud se pěstují v přítomnosti 1 % galaktosy.

Bakteriální inokula

K přípravě vakcíny se používá systém jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nanejvýš první subkulturou matečného inokula. Konečná vakcína představuje nanejvýš čtvrtou subkulturu původní vakcíny, se kterou byly provedeny laboratorní a klinické zkoušky prokazující vhodnost kmene.

Pro přípravu pracovního inokula se použije pouze takové matečné inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům.

Galaktosový metabolismus. Stanoví se spektrofotometricky; v cytoplazmě kmene Ty 21a není zjištěna žádná aktivita enzymu uridin difosfat-galaktosa-4-epimerasy.

Biosyntéza lipopolysacharidů. Lipopolysacharidy se extrahují metodou fenol-voda za tepla a zkoušejí chromatografií na molekulárním sítu. Kmen Ty 21a pěstovaný na půdě bez galaktosy vykazuje pouze přítomnost R typu lipopolysacharidu.

Sérologické charakteristiky. Kmen Ty 21a pěstovaný na syntetické půdě bez galaktosy se neaglutinuje specifickým anti-O:9 sérem. Vi antisérem se kmen Ty 21a neaglutinuje nikdy, bez ohledu na růstové podmínky. Kmen Ty 21a se aglutinuje H:d bičíkovým antisérem.

Biochemické markery. Kmen Ty 21a netvoří na Kliglerově agaru s obsahem železa sirovodík. Tato vlastnost slouží k jeho odlišení od ostatních galaktosa-epimerasa-negativních kmenů *S. typhi.*

Buněčný růst. Kmen Ty 21a lyzuje, když roste v přítomnosti 1 % galaktosy.

Množení a získávání bakterií

Bakterie z pracovního inokula se pomnoží v prekultuře, připraví se jedna subkultura a pak se při 30 °C pěstují 13 h až 15 h ve vhodné půdě obsahující 0,001 % galaktosy. Bakterie se sklidí tak, aby nedošlo ke kontaminaci jinými mikroorganismy.

K přípravě lyofilizované sklizně lze použít pouze takové jednotlivé sklizně, které vyhovují následujícím požadavkům.

Hodnota pH. 6,8 až 7,5; měří se kultura.

Optická hustota. 6,5 až 11,0; měřeno při 546 nm. Před měřením se kultura naředí tak, aby se naměřená hodnota pohybovala mezi 0,1 a 0,5 a podle ředění se pak skutečná hustota vypočítá.

Zkouška totožnosti. Bakterie se pěstují na agarové půdě obsahující 1 % galaktosy a modř bromthymolovou. Vytvoří se světle modré, konkávní, vzhledem k lýze buněk průhledné kolonie. Neobjeví se žádné žluté (galaktosu fermentující) kolonie.

Lyofilizovaná sklizeň

Sklizeň se smíchá s vhodným stabilizátorem a lyofilizuje postupem zaručujícím přežití nejméně 10 % bakterií a na takový obsah vody, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu vakcíny. K vakcíně se nepřidává žádná protimikrobní konzervační látka.

K přípravě konečné várky vakcíny se použije pouze taková lyofilizovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Zkouška totožnosti. Bakterie se pěstují na agarové půdě obsahující 1 % galaktosy a modř bromthymolovou. Vytvoří se světle modré, konkávní, vzhledem k lýze buněk průhledné kolonie. Neobjeví se žádné žluté (galaktosu fermentující) kolonie.

Počet živých bakterií. Nejméně 1 . 10^{11} živých mikrobů *S. typhi* kmene Ty 21a v gramu.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 1,5 % až 4,0 %.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví aseptickým smícháním jedné nebo více lyofilizovaných sklizní s vhodným sterilním vehikulem.

K přípravě šarže se použije pouze taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku.

Počet živých bakterií. Nejméně 40 . 10^{9} živých mikrobů *S.typhi* kmene Ty 21a v gramu.

Šarže

Konečná várka vakcíny se rozplní za aseptických podmínek do kapslí se stěnou odolnou proti žaludeční šťávě nebo do jiných vhodných obalů.

K použití se uvolní pouze šarže, která vyhovuje požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Počet živých bakterií. Výjimkou je požadovaná hodnota počtu živých bakterií, která je nejméně 4 . 10^{9} živých bakterií v dávce.

Zkouška totožnosti

Bakterie ze zkoušeného přípravku se pěstují na agarové půdě obsahující 1 % galaktosy a modř bromthymolovou. Vytvoří se světle modré, konkávní, vzhledem k lýze buněk průhledné kolonie. Neobjeví se žádné žluté (galaktosu fermentující) kolonie.

Zkoušky na čistotu

Cizí mikroorganismy (*2.6.12, 2.6.13*). Zkouška se provede na vhodných selektivních půdách. Plotnovou metodou se stanoví celkový počet živých mikroorganismů. Počet cizích mikroorganismů v jedné dávce není větší než 10^{2} bakterií a 20 hub. Není nalezen žádný patogenní mikroorganismus, zvláště *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* ani salmonela jiného kmene než Ty 21a.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). 1,5 % až 4,0 %; stanoví se z obsahu jedné tobolky nebo obalu.

Stanovení počtu živých bakterií

Ke zkoušce se použije nejméně pět dávek. Obsah jednotlivých dávek se v chladném prostředí zhomogenizuje při 4 °C v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) za použití mixéru a tolika skleněných

kuliček, aby vyčnívaly z tekutiny. Ihned po homogenizaci se připraví vhodné ředění suspenze ve vychlazeném rozpouštědle a očkuje se na agar s přísadou mozkosrdcové infuze. Inkubuje se 20 h až 36 h při (36 ± 1) °C. Zkoušený přípravek obsahuje v jedné dávce nejméně $2 \cdot 10^9$ živých mikrobů *S. typhi* Ty 21a.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:
- minimální množství živých bakterií v jedné dávce,
- že vakcína je pouze pro perorální použití.

Vaccinum hepatitidis A inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti hepatitidě A

Je to tekutý přípravek z vhodného kmene viru hepatitidy A pomnoženého v buněčných kulturách a inaktivovaného validovanou metodou. Vakcína je opalescentní suspenze.

Vakcína vyhovuje článku *Vaccina ad usum humanum.*

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a na systému buněčné banky. Výrobní metoda prokazatelně poskytuje stejnorodou vakcínu, která vyhovuje požadavkům na imunogenitu, neškodnost a stabilitu.

Výrobní metoda se validuje, aby se prokázalo, že přípravek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce neškodnosti pro imunní séra a humánní vakcíny (*2.6.9*).

Pokud není doloženo a schváleno jinak, virus v konečném přípravku neprojde více pasážemi z matečného inokula než virus použitý k přípravě vakcíny, která vyhověla v klinických studiích z hlediska neškodnosti a účinnosti.

Referenční přípravek. Část šarže, která byla prokazatelně nejméně tak imunogenní jako šarže, jež v klinické studii na mladých zdravých dospělých vykazovala nejméně 95% sérokonverzi, odpovídající hladině neutralizačních protilátek považované za ochrannou po úplné primární imunizaci, se používá jako referenční přípravek. Jako ochranná hladina protilátek se uznává 0,02 m.j./ml, stanoveno metodou ELISA.

Substrát pro pomnožování viru

Virus se pomnožuje v linii lidských diploidních buněk (*5.2.3*) nebo v kontinuální linii buněk schválené oprávněnou autoritou.

Inokula

Kmen viru hepatitidy A, který se používá k přípravě matečného inokula, se identifikuje vývojovými záznamy, které obsahují informace o původu kmene a o následné manipulaci s ním.

Pouze virus, který odpovídá následujícím požadavkům, se může použít pro pomnožování.

Zkouška totožnosti. Každé matečné a pracovní inokulum viru se identifikuje jako virus hepatitidy A pomocí specifických protilátek.

Koncentrace viru. K zajištění stejnorodosti výroby se stanoví koncentrace viru v matečném a pracovním inokulu.

Cizí agens. Matečná a pracovní inokula vyhovují požadavkům na inokula pro virové vakcíny (*2.6.16*). Jestliže byla pro izolaci virového kmene použita kultura primárních opičích buněk, provedou se navíc opatření, aby se zajistilo, že kmen není kontaminován opičími viry, jako jsou virus opičí imunodeficience, Ebola virus a Marburg virus.

Pomnožování viru a sklizeň

Veškeré činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostorách, kde nejsou zpracovávány jiné buňky. Při přípravě média pro kultivaci buněk se používá schválené sérum zvířecího (nikoli lidského) původu. Sérum a trypsin používané při přípravě buněčné suspenze a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens: trypsin vyhovuje článku *Trypsinum*. Médium pro kultivaci buněk může obsahovat indikátor pH, jako je fenolová červeň, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky). Několikanásobné sklizně z téže buněčné produkční kultury se mohou spojit a považovat za jednotlivou sklizeň.

Pouze jednotlivá sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít k přípravě vakcíny. Jestliže stanovení poměru virové koncentrace k obsahu antigenu provedené na vhodném počtu sklizní prokazuje pravidelnost výroby, může se tato zkouška následně vypustit při rutinní kontrole.

Zkouška totožnosti. Zkouška na obsah antigenu slouží také jako zkouška totožnosti jednotlivé sklizně.

Bakterie a houby (*2.6.1*). Jednotlivá sklizeň vyhovuje ve zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Jednotlivá sklizeň vyhovuje zkoušce na mykoplazmata; na každou půdu se použije 1 ml.

Kontrolní buňky. Kontrolní buňky z kultur produkčních buněk vyhovují zkoušce totožnosti a požadavkům na cizí agens (*2.6.16*).

Obsah antigenu. Stanoví se obsah antigenu hepatitidy A vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*) ke sledování pravidelnosti výroby; obsah je v rozmezí schváleném pro jednotlivý přípravek.

Poměr koncentrace viru k obsahu antigenu. Stálost poměru koncentrace infekčního viru, stanoveného vhodnou metodou na buněčné kultuře, k obsahu antigenu je stanoven validací na vhodném počtu jednotlivých sklizní.

Purifikace a purifikovaná sklizeň

Sklizeň, která může být spojením několika jednotlivých sklizní, se purifikuje validovanými metodami. Jsou-li pro pomnožení viru použity kontinuální buněčné linie, purifikační proces prokazatelně zahrnuje také důsledné snížení hladiny DNK hostitelských buněk.

Pouze purifikovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, může být použita k přípravě inaktivované sklizně.

Koncentrace viru. Koncentrace infekčního viru v purifikované sklizni se stanoví na vhodné tkáňové kultuře ke sledování pravidelnosti výroby a jako počáteční bod pro sledování inaktivační křivky.

Poměr antigenu k celkové bílkovině. Stanoví se obsah antigenu viru hepatitidy A vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*). Stanoví se obsah celkové bílkoviny validovanou metodou. Poměr obsahu antigenu viru hepatitidy A k obsahu celkové bílkoviny je v rozmezí schváleném pro jednotlivý přípravek.

Bovinní sérumalbumin. Nejvýše 50 ng v ekvivalentu jedné lidské dávky, stanoveno vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*). Jestliže to dovolí výrobní proces, lze použít jiné vhodné bílkovinné markery k průkazu účinné purifikace.

Zbytková DNK hostitelských buněk. Je-li pro pomnožení viru použita kontinuální buněčná linie, obsah zbytkové DNK hostitelských buněk, stanovený vhodnou imunochemickou metodou, jak je popsáno v článku *Producta ab ADN recombinante,* je nejvýše 100 pg v ekvivalentu jedné lidské dávky.

Zbytky chemikálií. Pokud se při purifikačních postupech používají chemické látky, provedou se na purifikované sklizni (nebo na inaktivované sklizni) zkoušky na tyto látky, pokud validace postupu neprokáže úplné odstranění. Koncentrace nepřesahuje rozmezí schválené pro jednotlivý přípravek.

Inaktivace a inaktivovaná sklizeň

Několik purifikovaných sklizní se může spojit před inaktivací. K zamezení interference v inaktivačním procesu se předchází tvorbě virových agregátů nebo se virové agregáty odstraňují bezprostředně před nebo během inaktivačního postupu. Virová suspenze se inaktivuje validovanou metodou; metoda je prokazatelně schopna stejnoměrně inaktivovat virus hepatitidy A bez poškození antigenní a imunogenní aktivity; jako část validační studie je nakreslena inaktivační křivka reprezentující koncentraci zbytkového živého viru měřenou nejméně třikrát (např. ve dni 0, 1 a 2 inaktivačního postupu). Při použití formaldehydu k inaktivaci se přítomnost zbytků volného formaldehydu stanovuje na konci inaktivačního procesu.

Pouze inaktivovaná sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

Inaktivace. Provede se pomnožovací zkouška na přítomnost zbytků infekčního viru hepatitidy A inokulací určitého množství inaktivované sklizně, odpovídající 5 % šarže, ale nejvýše 1500 dávek vakcíny do buněčných kultur téhož typu, který byl použit pro přípravu vakcíny. Po dvou pasážích se provede zkouška vhodné citlivosti na přítomnost zbytkového infekčního viru. Ve vzorcích odebraných na konci inaktivace se nenaleznou známky pomnožení viru hepatitidy A. Jako pozitivní kontrola se souběžně použije infekční virus k prokázání vnímavosti buněk a nepřítomnosti interference.

Sterilita. (*2.6.1*). Inaktivovaná virová sklizeň vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Jestliže se v konečném výrobku nemůže provést validní test na bakteriální endotoxiny, např. pro přítomnost adjuvans, provede se zkouška v inaktivované sklizni. Obsahuje nejvýše 2 m.j. endotoxinu v ekvivalentu jedné lidské dávky.

Obsah antigenu. Vhodnou imunochemickou metodou se stanoví obsah antigenu viru hepatitidy A (*2.7.1*).

Zbytky chemikálií. Pokud se při purifikačních postupech používají chemické látky, provedou se na inaktivované sklizni (nebo na purifikované sklizni) zkoušky na tyto látky, pokud validace postupu neprokáže úplné odstranění. Koncentrace nepřesahuje rozmezí schválené pro jednotlivý přípravek.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více inaktivovaných sklizní. Mohou se přidat schválená adjuvans, stabilizátory a protimikrobní konzervační látky.

Pouze taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

Sterilita. (*2.6.1*). Konečná várka vakcíny vyhovuje ve zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Protimikrobní konzervační látky. Při jejich použití se stanoví množství protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou. Množství je 85 % až 115 % zamýšleného množství.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů. Obaly se potom uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Pouze šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti se může uvolnit k použití. Za předpokladu, že zkouška na volný formaldehyd (přichází-li v úvahu) a stanovení obsahu protimikrobních konzervačních látek (přichází-li v úvahu) a stanovení účinnosti byly provedeny v konečné várce vakcín s vyhovujícími výsledky, lze je u šarže vypustit.

Zkoušky totožnosti

Obsah antigenu viru hepatitidy A ve vakcíně se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*) za použití specifických protilátek nebo zkouškou imunogenity na myších, popsanou v odstavci Stanovení účinnosti.

Zkoušky na čistotu

Hliník. Jestliže byl použit jako adsorbent hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, vyhovuje vakcína zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Volný formaldehyd. Při použití formaldehydu pro inaktivaci vyhovuje vakcína zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Protimikrobní konzervační látky. Při jejich použití se stanoví jejich množství vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou. Množství není nižší než nejnižší prokazatelně účinné množství a vyšší než 115 % množství uvedeného v označení.

Sterilita (*2.6.1*). Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 2 m.j. endotoxinu v jedné lidské dávce. Nelze-li provést validovanou zkoušku s konečnou šarží, např. pro přítomnost adjuvans, provede se zkouška s inaktivovanou sklizní.

Stanovení účinnosti

Buďto se účinnost vakcíny stanoví porovnáním množství nezbytného k vytvoření specifických protilátek u myší s množstvím referenčního přípravku potřebným k vyvolání téhož účinku, nebo se provede validované stanovení obsahu antigenu *in vitro*.

Zkouška na myších uvedená dále je příkladem metody, která byla shledána vhodnou pro danou vakcínu; mohou se použít i jiné validované metody.

Požadavek na účinnost. Horní mez spolehlivosti ($P = 0,95$) stanovené relativní účinnosti je nejméně 1,0.

Výběr a rozdělení zkoušených zvířat. Použijí se zdravé myši z jednoho chovu, staré 5 týdnů a prokazatelně vhodného kmene. Používají se zvířata téhož pohlaví. Zvířata se rozdělí do nejméně sedmi stejných skupin o počtech vhodných pro požadavky zkoušky.

Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny. K ředění se použije roztok *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahující hliníkové adjuvans použité pro vakcínu. Připraví se nejméně tři ředění zkoušené vakcíny a referenčního přípravku. Každému zvířeti ve skupině se subkutánně vstříkne nejvýše 1,0 ml ředění určeného pro skupinu. Kontrolní skupině neočkovaných zvířat se subkutánně vstříkne stejné množství výše uvedeného roztoku k ředění. Po 28 až 32 dnech se zvířatům podá anestezie, vykrvácejí se a jednotlivá séra se zpracují odděleně. V jednotlivých sérech se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*) stanoví obsah specifických protilátek proti hepatitidě A.

Výpočet. Výpočet se provede obvyklými statistickými metodami pro zkoušky s kvantitativní odpovědí (např. *5.3* Statistické hodnocení výsledků biologických zkoušek, sekce 4).

Podle rozložení reakčních hladin naměřených ve všech sérech nevakcinované skupiny se stanoví maximální reakční hladina, kterou lze nalézt u nevakcinovaných zvířat pro tuto zvláštní zkoušku. Odpověď ve vakcinovaných skupinách, která přesahuje tuto hladinu, je definována jako sérokonverze.

Provede se vhodná transformace na procentové vyjádření zvířat vykazujících sérokonverzi v každé skupině (např. probitová transformace) a provede se analýza dat podle rovnoběžného modelu log dávky - odpověď. Stanoví se účinnost zkoušeného přípravku ve vztahu k referenčnímu přípravku.

Validační podmínky. Zkoušku lze hodnotit, jestliže:
- pro zkoušenou i referenční vakcínu leží ED_{50} mezi nejnižší a nejvyšší dávkou podanou zvířatům,
- statistická analýza nevykazuje signifikantní odchylku od linearity nebo rovnoběžnosti,
- předpokládané limity odhadované relativní účinnosti leží mezi 33 % a 300 % stanovené účinnosti.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede biologický původ buněk a adjuvans použité pro přípravu vakcíny.

Vaccinum hepatitidis B (ADNr)

Vakcína proti hepatitidě B (rDNK) rekombinantní

Je to přípravek z povrchového antigenu viru hepatitidy B, základního proteinu viru hepatitidy B. Tento antigen se získává rekombinantní DNK technologií.

Přípravek vyhovovuje požadavkům článků *Producta ab ADN recombinante* a *Vaccina ad usum humanum*.

Výroba

Viz článek *Producta ab ADN recombinante*, zvláště v částech Klonování a exprese, Systém buněčných bank, Validace buněčných bank, Validace výrobního postupu a Pravidelnost výroby.

Přípravek prokazatelně podněcuje tvorbu specifických ochranných protilátek u člověka. Výrobní metoda prokazatelně poskytuje stále vakcínu, která vyhovuje požadavkům na imunogenitu a neškodnost.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude přípravek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*)

Přípravek se vyrábí expresí virového genu kódujícího povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg) v kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*) nebo v savčích buňkách (buňky ovaria čínského křečka nebo jiných vhodných buněčných linií) purifikací výsledného HBsAg a převedením tohoto antigenu do imunogenního přípravku. Vhodnost a neškodnost buněk schvaluje oprávněná autorita.

Přípravek může obsahovat produkt S genu (hlavní bílkovina), kombinaci S genového a pre-S2 genového produktu (střední bílkovina), nebo kombinaci S genového, pre-S2 genového a pre-S1 genového produktu (velká bílkovina).

Referenční přípravek. Jako referenční přípravek se používá část šarže reprezentující šarži vakcíny, která v klinické studii na mladých zdravých dospělých jedincích prokazatelně vykazuje nejméně 95% sérokonverzi (HBsAg protilátkový titr je větší než 10 m.j. v litru po úplné primární imunizaci).

Charakteristika látky

K charakteristice antigenu se provede vývojová studie, ve které se určí jeho úplná bílkovinná, lipidová a sacharidová struktura. Morfologické charakteristiky antigenních částic se stanoví elektronovou mikroskopií. Vhodná denzita antigenních částic se stanoví fyzikálně-chemickými metodami, např. gradientovou centrifugací. Charakterizují se antigenní epitopy. Bílkovinná frakce antigenu se charakterizuje primární strukturou (např. stanovením aminokyselinového složení, částečnou analýzou aminokyselinové sekvence a mapováním peptidů).

Kultura a sklizeň

Totožnost, mikrobiologická čistota, plazmidová retence a konzistence sklizně jsou určeny vhodným výrobním uspořádáním. Jestliže jsou použity savčí buňky, provedou se zkoušky na cizí antigeny a mykoplazmata podle stati Důkaz cizích antigenů v lidských virových vakcínách (*2.6.16*).

Přečištěný antigen

Pro přípravu konečné várky se použije pouze přečištěný antigen, který odpovídá následujícím požadavkům.

Celková bílkovina. Stanoví se validovanou metodou. Obsah je v rozmezí schváleném pro specifický přípravek.

Totožnost a obsah antigenu. Množství a specificita HBsAg se stanoví porovnáním s mezinárodním standardem HBsAg subtypu *ad* nebo s národním referenčním přípravkem za pomoci vhodné imunochemické metody (*2.7.1*), jako je radioimunoanalýza, enzymové imunosorbentové stanovení (ELISA), imunoblot (přednostně se užívají monoklonální protilátky přímo proti protektivnímu epitopu), nebo jednoduchou radiální difuzí. Poměr antigenu k bílkovině je v rozmezí schváleném pro specifický přípravek. Molekulová hmotnost v hlavním pásu zjištěná elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíranem sodným (SDS-PAGE) za redukovaných podmínek odpovídá očekávané hodnotě z genové sekvence a možné glykosylace.

Čistota antigenu. Stanoví se srovnáním s referenčním přípravkem za použití kapalinové chromatografie nebo jiné vhodné metody, jako je SDS-PAGE s barvením modří kyselou 92 a stříbrem.

Vhodná metoda musí být dost citlivá k detekci možného znečištění v koncentraci 1 % celkové bílkoviny. Nejméně 95 % celkové bílkoviny tvoří povrchový antigen hepatitidy B.

Složení. Stanoví se obsah bílkovin, lipidů, nukleových kyselin a sacharidů.

DNK hostitelských buněk a vektorem derivovaná DNK. Nejvýše 10 pg DNK v množství přečištěného antigenu odpovídajícím jedné lidské dávce vakcíny. Stanoví se u přípravků vyrobených pomocí savčích buněk.

Cesium. Jestliže se při výrobě použijí cesiové soli, provede se v přečištěném antigenu stanovení zbytků cesia. Obsah je v rozmezí schváleném pro specifický přípravek.

Sterilita (*2.6.1*). Přečištěný antigen vyhovuje zkoušce na sterilitu. Na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Další zkoušky se mohou u přečištěného antigenu požadovat v závislosti na použité výrobní metodě: např. stanovení zbytků zvířecího séra, jestliže byly pro výrobu použity savčí buňky, nebo zkoušky na zbytky chemikálií používaných při extrakci a čištění.

Konečná várka vakcíny

Vakcína může obsahovat protimikrobní konzervační látku a adjuvans.

Pouze várka, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

Protimikrobní konzervační látky. Kde jsou použity, stanoví se jejich obsah vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou. Obsah je v rozmezí 85 % až 115 % deklarovaného množství.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu. Na každou živnou půdu se použije 10 ml konečné várky.

Šarže

K použití se propustí jenom ta konečná šarže, která vyhovuje každému požadavku uvedenému dále v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Jestliže zkoušky na volný formaldehyd, obsah protimikrobních konzervačních látek a účinnost na zvířatech byly provedeny v konečné várce vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou být tyto zkoušky u šarže vypuštěny.

Zkouška totožnosti

Totožnost přípravku se prokáže stanovením účinnosti nebo ve vhodných případech elektroforetickým profilem.

Zkoušky na čistotu

Hliník. Jestliže je použit hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý jako sorbent, vyhovuje přípravek zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Volný formaldehyd. Při použití formaldehydu vyhovuje přípravek zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Jestliže byly použity, stanoví se jejich obsah vhodnou chemickou nebo fyzikálně-chemickou metodou. Jejich obsah není nižší než prokazatelně nejmenší účinné množství a není vyšší než 115 % deklarovaného množství.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se každému králíkovi nitrožilně vstříkne ekvivalent lidské dávky.

Místo zkoušky na pyrogenní látky se může použít validovaná zkouška na bakteriální endotoxiny (*2.6.14*).

Stanovení účinnosti

Účinnost zkoušeného přípravku se stanoví buď na zvířatech porovnáním jeho schopnosti v daných podmínkách indukovat tvorbu specifických protilátek anti-HBsAg u myší nebo morčat se stejnou schopností referenčního přípravku, nebo stanovením obsahu antigenu validovanou metodou *in vitro*.

Požadavek na účinnost. Horní mez spolehlivosti (P = 0,95) stanovené relativní účinnosti je nejméně 1,0.

Zkouška na zvířatech

Výběr a rozdělení zvířat. Použijí se zdravé myši z jednoho chovu, staré asi 5 týdnů. Použitý kmen myší pro tuto zkoušku dává signifikantní směrnici v křivce závislosti odpovědi na dávce antigenu: vhodné jsou myši s haplotypem H-2^q nebo H-2^d. Také jsou vhodná zdravá morčata hmotnosti 300 g až 350 g (stará asi 7 týdnů) z jednoho chovu. Zvířata jsou stejného pohlaví. Rozdělí se do nejméně sedmi stejných skupin o počtu vhodném pro hodnocení výsledků.

Stanovení účinnosti zkoušeného přípravku. K ředění přípravku se použije roztok *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahující hlinité adjuvans nebo jiné vhodné rozpouštědlo. Připraví se nejméně tři vhodná ředění zkoušeného přípravku a souhlasná ředění referenčního přípravku. Ředění se intraperitoneálně vstříknou v množství nejvýše 1,0 ml každému zvířeti ve skupině, pro kterou je ředění určeno. Jedna skupina zvířat zůstane neočkována, vstříkne se jí pouze intraperitoneálně stejný objem ředicího roztoku. Ve vhodném časovém intervalu (např. mezi čtyřmi až šesti týdny) se zvířatům v anestezii odebere krev a odděleně se získají jednotlivá séra. Pro každé sérum se provede vhodná imunoanalýza pro stanovení specifických HBsAg protilátek (*2.7.1*).

Výpočty. Výpočty se provedou běžnými statistickými metodami pro zkoušky s kvantitativní odpovědí (*5.3* Statistická analýza výsledků biologických zkoušek, sekce 4).

Z rozložení reakčních hodnot naměřených ve všech sérech neočkované skupiny se stanoví nejvyšší reakční hladina pro nevakcinované zvíře. Všechny odpovědi u vakcinovaných zvířat, které převyšují tuto hodnotu, se označí za sérokonverzi.

Procento zvířat vykazujících sérokonverzi v každé skupině se vhodně transformuje (např. probitovou transformací) a použije se model rovnoběžnosti křivek závislosti log dávky a odpovědi. Relativní účinnost zkoušeného přípravku se stanoví vzhledem k referenčnímu přípravku.

Validační podmínky. Zkoušku lze hodnotit, jestliže:
- pro zkoušený a referenční přípravek leží ED_{50} mezi nejvyšší a nejnižší dávkou podanou zvířatům,
- statistická analýza neukazuje žádnou odchylku od podmínek linearity ani modelu rovnoběžnosti,
- meze spolehlivosti relativní účinnosti jsou mezi 33 % a 300 % stanovené účinnosti.

ED_{50} (50% účinná dávka) je statisticky vypočtená dávka vakcíny, která v podmínkách zkoušky u 50 % zvířat indukuje specifické protilátky na relevantní vakcinační antigeny.

Metody *in vitro*

Místo zkoušky na zvířatech lze použít některé validované metody *in vitro*. Vhodné jsou enzymově imunosorbentová stanovení (ELISA) a radioimunoanalýza s použitím monoklonálních protilátek specifických pro ochranu indukující epitopy HBsAg.

Vhodný počet ředění zkoušeného přípravku se porovnává s referenčním přípravkem za použití modelu rovnoběžnosti k analýze dat, která jsou vhodným způsobem transformována. Soupravy k měření HBsAg *in vitro* jsou běžně dostupné a mohou se přizpůsobit ke stanovení účinnosti vakcíny in vitro.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- obsah HBsAg v obalu,
- typ buněk použitých k výrobě vakcíny,
- název a množství adjuvans,
- že se vakcína před použitím roztřepe,
- že vakcína nesmí zmrznout.

Vaccinum hepatitidis contagiosae caninae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti infekční hepatitidě psů lyofilizovaná

Je to přípravek obsahující jeden nebo více oslabených kmenů psích adenovirů.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Oslabený virus se pomnožuje ve vnímavé buněčné kultuře (*5.2.4*).

Výběr vakcinačního kmene

K přípravě vakcíny se může použít pouze kmen viru prokazatelně uspokojivý z hlediska oslabení a imunogenity. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se použijí následující zkoušky.

Oslabení. Když se vnímavému štěněti starému osm až šestnáct týdnů intravenózně vstříkne objem virové suspenze odpovídající jedné dávce vakcíny, nevyvolá příznaky onemocnění, ale u zvířete se do 21 dní vyvinou specifické neutralizující protilátky.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k prokázání imunogenity kmene.

Zkoušení šarže

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s vyhovujícím výsledkem na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, jestliže k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Když se vakcína rozpustí předepsaným způsobem a smíchá s jedním nebo více specifickými antiséry, nevyvolává již ve vnímavé buněčné kultuře specifický cytopatický efekt.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým, 8 až 16 týdnů starým štěňatům, která jsou prosta specifických neutralizačních protilátek, se každému podá způsobem uvedeným v označení dvojnásobek dávky rozpuštěného přípravku. Zvířata se pozorují 21 dní. Zvířata zůstanou zcela zdravá a nemají příznaky keratitidy.

Cizí viry.

A. Rozpuštěná vakcína se smíchá s jedním nebo více specifickými antiséry. Ve vnímavé buněčné kultuře již nevyvolá cytopatický efekt, ani se v ní nedokážou hemaglutinační ani hemadsorpční látky.

B. Zkouška se provede na myších hmotnosti 11 g až 15 g. Každé myši se intracerebrálně vstříkne 0,03 ml rozpuštěné vakcíny. Použije se tolik myší, aby se podaly 3/10 dávky vakcíny, nejméně však deset myší. Zvířata se pozorují 21 dní. Jestliže během prvních 48 h uhynou více než dvě myši, zkouška se opakuje. Od třetího do jedenadvacátého dne po podání nevykážou myši žádné abnormality, jež by bylo možno přisoudit vakcíně.

Bakterie a houby. Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Rozpuštěná vakcína vyhovuje ve zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Titr viru v rozpuštěném přípravku se stanoví na vnímavé buněčné kultuře. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství virových částic, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použije se sedm vnímavých štěňat ve stáří osmi až šestnácti týdnů, která nemají protilátky proti psím adenovirům. Způsobem uvedeným v označení se každému z pěti zvířat vstříkne objem rozpuštěné vakcíny obsahující množství viru, které odpovídá nejnižšímu titru uvedenému v označení. Dvě štěňata se ponechají jako kontrola. Všechna zvířata se pozorují 21 dní. Potom se každému zvířeti nitrožilně vstříkne takové množství virulentního kmene infekční hepatitidy psů, které u vnímavých psů stačí k vyvolání úhynu nebo typických příznaků nemoci. Zvířata se pozorují dalších 21 dní. Vakcinovaná zvířata zůstanou zdravá a kontrolní zvířata buďto uhynou, nebo jeví typické příznaky vážné infekce. Pokud jedno z kontrolních zvířat nemá žádné příznaky nemoci, stanovení se opakuje.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum influenzae equi inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti chřipce koní

Je to suspenze jednoho nebo více kmenů virů chřipky koní inaktivovaná takovým způsobem, aby se nenarušila imunogenita kmenů.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Každý kmen viru se inokuluje odděleně do alantoidní dutiny kuřecích embryí starých 9 až 11 dní pocházejících ze zdravého chovu. Vejce se inkubují při vhodné teplotě 2 až 3 dny. Potom se odebere alantoidní tekutina. Virové suspenze každého kmene se odeberou odděleně a inaktivují se. Je-li to třeba, mohou se purifikovat. Mohou se přidat i vhodná adjuvancia a protimikrobní konzervační látky. Vakcína se může lyofilizovat.

Výběr složení vakcíny

Vakcína je prokazatelně dostatečná z hlediska imunogenity. K prokázání účinnosti se může použít zkouška dále popsaná (*5.2.7*).

Imunogenita. Zkouška na koních popsaná v odstavci Stanovení účinnosti se může použít při prokazování imunogenity.

Zkoušení šarže

Pokud bylo stanovení účinnosti na koních provedeno s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkoušky totožnosti

Přípravek u vnímavých druhů vyvolá tvorbu specifických protilátek detekovatelných hemaglutinačně inhibičním testem.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Nejméně dvěma koňům se vstříkne na dvě různá místa zkoušený přípravek v dávce uvedené v označení. Za 4 týdny se vakcinace opakuje. Zvířata se pozorují dalších 10 dní. Neprojeví se žádná významná místní ani celková reakce.

Inaktivace. Do alantoidní dutiny deseti kuřecích embryí 9 až 11 dní starých se naočkuje po 0,2 ml zkoušeného přípravku. Embrya se inkubují 3 dni ve vhodné teplotě. Smrt embrya do 24 h od inokulace se považuje za nespecifický úhyn a vejce se vyřadí. Z každého embrya se odebere alantoidní tekutina a vytvoří se směsný vzorek. Stejným způsobem se na embryích provede druhá pasáž. Po čtyřech dnech inkubace nevykazuje alantoidní tekutina těchto kuřecích embryí žádnou hemaglutinační účinnost.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

a) Na koních. Každému z pěti vnímavých séronegativních koní se doporučeným způsobem vstříkne jedna dávka zkoušeného přípravku. Za dobu uvedenou v označení jako interval mezi první a druhou

vakcinací se vstříkne objem odpovídající druhé dávce vakcíny. Každému zvířeti se odeberou dva vzorky krve, první za týden po první vakcinaci, druhý za dva týdny po druhé vakcinaci. Z každého vzorku krve se oddělí sérum. Séra se inaktivují zahřátím 30 min na 56 °C. K jednomu objemovému dílu séra se přidají tři objemové díly *tlumivého roztoku fosforečnanového s chloridem sodným o pH 7,4* a čtyři objemové díly suspenze *kaolinu lehkého R* ve stejném tlumivém roztoku (250 g/l). Všechny směsi se 10 min protřepávají při pokojové teplotě. Poté se odstředí, oddělí se supernatant, který se smíchá s koncentrovanou suspenzí kuřecích erytrocytů. Inkubuje se 60 min při 37 °C a odstředí se. Ředění získaného séra je 1 : 8. Ke zkoušení sér se použije antigen nebo antigeny připravené z kmene nebo kmenů použitých k výrobě vakcíny. Z každého zředěného séra se připraví řada dvojnásobných ředění. K 0,025 ml naředěného séra se přidá 0,025 ml suspenze každého antigenu (který byl napřed ošetřen *etherem R*) obsahující čtyři hemaglutinační jednotky. Směsi se nechají 30 min stát při pokojové teplotě a poté se přidá 0,05 ml 0,5% suspenze kuřecích erytrocytů. Nechá se dále stát 1 h při pokojové teplotě a zaznamená se poslední ředění séra, ve kterém ještě došlo k úplné inhibici hemaglutinace.

Titr protilátek u sér odebraných po druhé vakcinaci není nižší než 1 : 64 (do hodnoty ředění se nezapočítávají objemy suspenzí antigenu a erytrocytů). Pokud u některých zvířat ukazuje nalezený titr protilátek po první vakcinaci, že to je anamnestická odpověď, nebere se tento výsledek v úvahu, ale provede se za stejných podmínek doplňující stanovení s tolika zvířaty, kolik jich mělo anamnestickou odpověď.

b) Na morčatech. Každému z deseti morčat prostých specifikovaných protilátek se podkožně vstříkne dávka uvedená v označení. Za 21 dní se odeberou vzorky krve a oddělí se sérum. Séra se inaktivují zahřátím 30 min na 56 °C. K jednomu objemovému dílu séra se přidají tři objemové díly *tlumivého roztoku fosforečnanového s chloridem sodným o pH 7,4* a čtyři objemové díly suspenze *kaolinu lehkého R* ve stejném tlumivém roztoku (250 g/l). Všechny směsi se 10 min protřepávají při pokojové teplotě. Poté se odstředí, oddělí se supernatant, který se smíchá s koncentrovanou suspenzí kuřecích erytrocytů. Inkubuje se 60 min při 37 °C a odstředí se. Ředění získaného séra je 1 : 8. Ke zkoušení sér se použije antigen nebo antigeny připravené z kmene nebo kmenů použitých k výrobě vakcíny. Z každého zředěného séra se připraví řada dvojnásobných ředění. K 0,025 ml každého naředěného séra se přidá 0,025 ml suspenze každého antigenu (který byl napřed ošetřen *etherem R*) obsahující čtyři hemaglutinační jednotky. Směsi se nechají 30 min stát při pokojové teplotě a poté se přidá 0,05 ml 0,5% suspenze kuřecích erytrocytů. Nechá se dále stát 1 h při pokojové teplotě a zaznamená se poslední ředění séra, ve kterém ještě došlo k úplné inhibici hemaglutinace.

Titr protilátek u žádného séra v žádné zkoušce není nižší než 1 : 16 (do hodnoty ředění se nezapočítávají objemy suspenzí antigenu a erytrocytů).

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede:

- stáří, ve kterém by se měla zvířata vakcinovat,
- interval mezi první a druhou vakcinací,
- požadovaná revakcinace.

Vaccinum influenzae inactivatum ad suem

Inaktivovaná vakcína proti chřipce prasat

Je to vodná suspenze, olejová emulze nebo lyofilizovaný přípravek jednoho nebo více inaktivovaných kmenů prasečího nebo lidského chřipkového viru. Vhodné kmeny obsahují jak hemaglutinin, tak neuraminidasu.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Virus se pomnožuje v alantoidní dutině kuřecích embryí ze zdravého chovu (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*).

Každý virový kmen se pomnožuje odděleně. Jednotlivé suspenze se shromažďují odděleně a inaktivují metodou, která vylučuje poškození imunogenity. Je-li to třeba, purifikují se.

S každou šarží antigenu se ihned po inaktivaci provede pomnožovací zkouška na zbylý infekční virus chřipky pasážováním ve stejném typu substrátu, jaký byl použit při výrobě (kuřecí embrya nebo buněčné kultury), nebo v substrátu, u něhož byla prokázána nejméně stejná citlivost. Ke zkoušce použité množství inaktivovaného viru odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Neprokáže se žádný živý virus.

Pokud se zkouška inaktivace u vakcíny z buněčných kultur nemůže provést u hotové šarže pro přítomnost olejového adjuvans, provede se zkouška na zbylý infekční chřipkový virus ve várce každé vakcíny bezprostředně před přidáním adjuvans. Provedou se dvě pasáže ve stejném typu substrátu, jaký byl použit při výrobě vakcíny. Množství inaktivovaného viru použité v této zkoušce je nejméně deset dávek vakcíny. Neprokáže se žádný živý virus.

Vakcína může obsahovat jedno nebo více vhodných adjuvans; může být lyofilizovaná.

Výběr složení vakcíny

Výběr kmenů je založen na antigenních typech a subtypech zjištěných v Evropě. Prokáže se, že vakcína je dostatečná z hlediska bezpečnosti a imunogenity pro prasata. Bezpečnost (*5.2.6*) a účinnost (*5.2.7*) se mohou prokázat dále uvedenými zkouškami.

Bezpečnost.

A. Zkouška se provede s každou kategorií zvířat, pro kterou je přípravek určen (prasnice, výkrmová prasata). Použitá zvířata nemají protilátky proti viru chřipky prasat. Nejméně deseti zvířatům se vstříkne doporučeným způsobem po dvou dávkách vakcíny. Po čtrnácti dnech se každému zvířeti vstříkne jedna dávka vakcíny a zvířata se pozorují ještě 14 dní. Během 28 dní trvání zkoušky se neprojeví žádná významná místní ani celková reakce.

B. K vyhodnocení bezpečnosti se použijí též zvířata ze zkoušky imunogenity. Každému vakcinovanému zvířeti se změří rektální teplota při vakcinaci, za 24 h a za 48 h. Nezjistí se významný účinek na rektální teplotu, ani jiná systémová reakce (např. anorexie). Při porážce se vyšetří místo podání a nezjistí se žádná významná místní reakce.

C. K vyhodnocení bezpečnosti se použijí též zvířata z terénní zkoušky. Zkouška se provede s každou kategorií zvířat, pro kterou je přípravek určen (prasnice, výkrmová prasata). Použijí se nejméně tři skupiny po nejméně dvaceti zvířatech a jedna kontrolní skupina o nejméně deseti zvířatech. Každému zvířeti se změří rektální teplota při vakcinaci, za 24 h a za 48 h. Nezjistí se významný účinek na rektální teplotu. Při porážce se vyšetří místo podání a nezjistí se žádná významná místní reakce.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti se může použít k důkazu imunogenity přípravku.

Zkouška účinnosti šarže

Dále popsaná zkouška se neprovádí při běžném zkoušení šarží. Provede se jednou nebo několikrát s určitou vakcínou podle rozhodnutí nebo souhlasu oprávněné autority. Tam, kde se tato zkouška neprovede, použije se vhodná validovaná zkouška, kritéria pro přijetí jsou určena podle šarže, která má vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti. Následující zkouška se může použít po uspokojivé korelaci se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti po provedení statistického vyhodnocení.

Pěti séronegativním morčatům pět až sedm týdnů starým se podkožně vstříkne po jedné čtvrtině dávky uvedené v označení. Před vakcinací a za 21 dní po ní se zvířatům odebere krev. V každém vzorku se stanoví hladina specifických protilátek proti všem virovým kmenům ve vakcíně buďto hemaglutinačně inhibičním, nebo jiným vhodným testem. Přípravek vyhovuje, jestliže hladina protilátek není nižší než hladina zjištěná u té šarže, která dává uspokojivé výsledky při zkoušce účinnosti na prasatech (viz Stanovení účinnosti).

Zkoušky totožnosti

Jestliže přípravek neobsahuje adjuvans, provede se zkouška A, v opačném případě se provede zkouška B.

A. Antigenní specifita se potvrdí imunodifuzí s imunním sérem specifickým pro hemaglutininy a neuraminidasy obsažené ve zkoušeném přípravku.

B. Když se přípravek vstříkne dvěma zdravým a vnímavým zvířatům, vyvolá tvorbu specifických protilátek proti hemaglutininům a neuraminidasám v něm obsaženým. Protilátky se mohou zjistit vhodnou metodou, jako je imunodifuze.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma prasatům minimálního věku pro vakcinaci se vstříkne po dvojité dávce zkoušeného přípravku způsobem uvedeným v označení. Zvířata se pozorují 14 dní a poté se každému vstříkne jedna dávka zkoušeného přípravku. Zvířata se pozorují dalších 14 dní. Během 28 dní trvání zkoušky se neprojeví žádná významná místní ani celková reakce.

Inaktivace. Jestliže byl zkoušený přípravek vyroben na kuřecích embryích, naočkuje se po 0,2 ml do alantoidních dutin deseti kuřecích embryí, starých 9 až 10 dní, a nechá se 3 dni inkubovat při vhodné teplotě. Smrt embrya do 24 h od inokulace se považuje za nespecifický úhyn a vejce se vyřadí. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže přežije nejméně 80 % embryí. Z každého embrya se odebere alantoidní tekutina, stejné objemové díly všech tekutin se smíchají a stejným způsobem se na kuřecích embryích provede druhá pasáž. Inkubuje se 4 dny. Alantoidní tekutina z těchto kuřecích embryí nevykazuje žádnou hemaglutinační účinnost.

Jestliže byl zkoušený přípravek vyroben na buněčných kulturách, provede se vhodná zkouška na zbylý infekční virus chřipky s použitím dvou pasáží ve stejném typu buněčné kultury, jaký byl použit při výrobě. Nezjistí se žádný živý virus. Jestliže zkoušený přípravek obsahuje olejové adjuvans, které ruší při zkoušce, oddělí se vodná fáze takovým způsobem, který nezmenší schopnost zkoušky prokázat zbylý infekční virus chřipky.

Cizí viry. U prasat použitých ve zkoušce bezpečnosti se provedou zkoušky na protilátky. Zkoušený přípravek nevyvolá tvorbu jiných protilátek než proti viru chřipky. Zejména se nezjistí protilátky

proti virům patogenním pro prasata nebo proti virům, které by mohly překážet při diagnóze infekčních onemocnění prasat (včetně virů ze skupiny pestivirů).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Zkouška účinnosti se provede s každým kmenem použitým při výrobě. Použijí se vnímavá séronegativní prasata v minimálním věku doporučeném pro vakcinaci. Deset prasat se naočkuje, jak je doporučeno v označení, a deset prasat slouží jako kontrola. Za tři týdny po vakcinaci se všechna prasata v anestezii intratracheálně čelenžují vhodným množstvím terénního virulentního viru chřipky. Z každé skupiny se za 24 h po čelenži porazí pět prasat, přednostně při hypertermii. Změří se množství viru chřipky přítomné v určitém stejném množství rozdrceného pravého diafragmatického laloku plic poražených prasat. Množství viru v plicích vakcinovaných prasat je významně menší než v plicích kontrolních zvířat. U zbývající pětice prasat z obou skupin se 7 dní pozorují klinické příznaky, zejména se každý den u každého prasete zaznamenává rektální teplota. V den čelenže a o 4 dni později se každé prase zváží. Hmotnost vakcinovaných prasat za 4 dni po čelenži je významně vyšší. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže se u kontrolních prasat projeví závažné klinické příznaky (hypertermie, anorexie). U vakcinovaných prasat může být pozorován mírný vzestup rektální teploty.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článěk *Vaccina ad usum veterinarium*.
V označení na obalu se uvedou virové kmeny obsažené ve vakcíně.

Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum

Inaktivovaná vakcína proti chřipce (povrchový antigen)

Je to sterilní vodná suspenze kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B nebo směs kmenů obou typů. Virové kmeny se pěstují odděleně v kuřecích embryích, inaktivují se a ošetří tak, aby byl zachován hemaglutinační a neuraminidasový antigen bez snížení antigenních vlastností těchto antigenů.

Uvedené množství hemaglutinačního antigenu každého kmene obsažené ve vakcíně je 15 μg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je čirý roztok.

Výroba

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost pro humánní imunní séra a vakcíny (*2.6.9*).

Výběr vakcinačního kmene

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace, a je-li třeba, doporučuje nové kmeny odpovídající aktuální epidemiologické situaci. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Konvence o přípravě Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí užívat vybrané kmeny mající vysoké výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

Substrát pro pomnožení viru

Inokulum pro výrobu vakcíny se pomnoží v kuřecích embryích z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*), například kuřecích embryonálních fibroblastech nebo kuřecích ledvinných buňkách získaných z chovů kuřat prostých specifikovaných patogenů. Pro výrobu se virus každého kmene pěstuje v alantoidní dutině oplozených slepičích vajec ze zdravého chovu.

Virové inokulum

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného virového izolátu. Finální vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula. Pro potvrzení správnosti kmene chřipky se vhodnou metodou ověřuje hemaglutininový a neuramidasový antigen každého inokula. K přípravě monovalentní spojené sklizně se použije pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*), na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

Pomnožování a sklizeň viru

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci v kontrolované teplotě se odebere alantoidní tekutina a smíchá se do monovalentní spojené sklizně. Protimikrobní látka se může přidat i v době odběru. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin ani streptomycin.

Monovalentní spojená sklizeň

K omezení možnosti kontaminace se inaktivace zahájí co nejdříve možno po přípravě. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem na třech po sobě jdoucích šaržích prokázána stejná účinnost. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; postup může změnit hemaglutinační a neuraminidasový antigen co nejméně. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus ptačí leukózy a mykoplazmata. Jestliže se monovalentní spojená sklizeň uchovává po inaktivaci, použije se teplota (5 ± 3) °C. Při použití formaldehydového roztoku nepřesahuje jeho koncentrace v žádné chvíli inaktivace 0,2 g/l; při použití beta-propiolaktonu jeho koncentrace nepřesahuje v žádné chvíli inaktivace 0,1 % (*V/V*).

Před nebo po inaktivačním postupu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje vysokoobrátkovým odstřeďováním nebo jinou vhodnou metodou. Virové částice se rozštěpí na subjednotkové složky schválenými postupy a následně se purifikují, takže monovalentní várka sestává převážně z hemaglutinačních a neuraminidasových antigenů.

Jen taková monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

Hemaglutinační antigen. Obsah hemaglutinačního antigenu se stanoví imunodifuzí (*2.7.1*), porovnáním s referenčním antigenem[6)] nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního antigenu. Zkouška se provede při 20 °C až 25 °C.

Neuraminidasový antigen. Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Virová inaktivace. Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

Čistota. Čistota monovalentní spojené sklizně se zjišťuje polyakrylamidovou gelovou elektroforézou nebo jinou schválenou metodou. Prokážou se zejména hemaglutinační a neuraminidasové antigeny.

Chemikálie použité ke štěpení a purifikaci. Zkoušky na chemikálie použité ke štěpení a purifikaci se provedou s monovalentní spojenou sklizní, limity schvaluje oprávněná autorita.

Konečná várka vakcíny

Odpovídající množství monovalentních spojených sklizní se smíchá do konečné várky vakcíny. K přípravě šarže se může použít jen taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látka. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je nejméně 85 % a nejvýše 115 % zamýšleného množství.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. K použití se může uvolnit jen taková šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu. Za předpokladu, že zkouška na virovou inaktivaci byla provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně a že zkoušky na volný formaldehyd, ovalbumin a celkové bílkoviny byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže tyto zkoušky vynechat.

Zkouška totožnosti

Antigenní specifita se ověřuje při stanovení obsahu.

Zkoušky na čistotu

Virová inaktivace. 0,2 ml zkoušeného přípravku se vstříkne do alantoidní dutiny každého z deseti oplozených vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se smíchají. 0,2 ml směsného vzorku se vstříkne dalším deseti oplozeným vejcím a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že přežije osm

[6)] Referenční hemaglutinační antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru.

Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

Celkové bílkoviny. Nejvýše 40 μg jiné bílkoviny než hemaglutinin na virový kmen v lidské dávce a nejvýše celkem 120 μg bílkoviny jiné než hemaglutinin v lidské dávce.

Volný formaldehyd. Vyhovuje zkoušce na volný formaldehyd předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látka. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství.

Ovalbumin. Nejvýše 1 μg ovalbuminu v lidské dávce, stanoveno vhodnou metodou s použitím vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 100 m.j. endotoxinu v lidské dávce.

Stanovení obsahu

Obsah hemaglutinačního antigenu se stanoví imunodifuzí (*2.7.1*), porovnáním s hemaglutinačním referenčním antigenem nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního antigenu. Zkouška se provede při 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti (P = 0,95) této zkoušky je v rozmezí 80 % až 125 % zjištěného obsahu. Dolní mez spolehlivosti (P = 0,95) odhadu obsahu hemaglutinačního antigenu je nejméně 80 % množství deklarovaného v označení pro každý kmen.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích,
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použitých k přípravě vakcíny,
- metoda inaktivace,
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen na dávku,
- sezóna, v níž je vakcína určena k ochraně.

Vaccinum influenzae inactivatum ex viris integris praeparatum

Inaktivovaná vakcína proti chřipce (celý virion)

Je to sterilní vodná suspenze kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B nebo směs kmenů obou typů. Virové kmeny se pěstují odděleně v kuřecích embryích a inaktivují se tak, aby jejich antigenní vlastnosti zůstaly zachovány. Uvedené množství antigenu hemaglutininu každého kmene obsaženého ve vakcíně je 15 μg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je slabě opaleskující tekutina.

Výroba

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost pro humánní imunní séra a vakcíny (*2.6.9*).

Výběr vakcinačního kmene

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace, a je-li třeba, doporučuje nové kmeny odpovídající aktuální epidemiologické situaci. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Konvence o přípravě Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí užívat vybrané kmeny mající vysoké výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

Substrát pro pomnožení viru

Inokulum pro výrobu vakcíny se pomnoží v kuřecích embryích z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*), například kuřecích embryonálních fibroblastech nebo kuřecích ledvinných buňkách získaných z chovů kuřat prostých specifikovaných patogenů. Pro výrobu se virus každého kmene pěstuje v alantoidní dutině oplozených slepičích vajec ze zdravého chovu.

Virové inokulum

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného virového izolátu. Finální vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula. Pro potvrzení správnosti kmene chřipky se vhodnou metodou ověřuje hemaglutininový a neuramidasový antigen každého inokula. K přípravě monovalentní spojené sklizně se použije pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům.

Bakteriální a plísňová kontaminace. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*), na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

Pomnožování a sklizeň viru

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci v kontrolované teplotě se odebere alantoidní tekutina a smíchá se do monovalentní spojené sklizně. Protimikrobní látka se může přidat i v době odběru. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin ani streptomycin.

Monovalentní spojená sklizeň

K omezení možnosti kontaminace se inaktivace zahájí co nejdříve možno po přípravě. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem na třech po sobě jdoucích šaržích prokázána stejná účinnost. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; postup může změnit hemaglutinační a neuraminidasový antigen co nejméně. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus ptačí leukózy a mykoplazmata. Jestliže se monovalentní spojená sklizeň uchovává po inaktivaci, použije se teplota (5 ± 3) °C. Při použití formaldehydového roztoku nepřesahuje jeho koncentrace v žádné chvíli inaktivace 0,2 g/l; při použití beta-propiolaktonu jeho koncentrace nepřesahuje v žádné chvíli inaktivace 0,1 % (*V/V*).

Před nebo po inaktivačním postupu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje vysokoobrátkovým odstřeďováním nebo jinou vhodnou metodou.

Jen taková monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

Hemaglutinační antigen. Obsah hemaglutinačního antigenu se stanoví imunodifuzí (*2.7.1*), porovnáním s referenčním antigenem[7)] nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního antigenu. Zkouška se provede při 20 °C až 25 °C.

Neuraminidasový antigen. Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Virová inaktivace. Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

Konečná várka vakcíny

Odpovídající množství monovalentních spojených sklizní se smíchá do konečné várky vakcíny. K přípravě šarže se může použít jen taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látka. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je nejméně 85 % a nejvýše 115 % zamýšleného množství.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. K použití se může uvolnit jen taková šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu. Za předpokladu, že zkouška na virovou inaktivaci byla provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně a že zkoušky na volný formaldehyd, ovalbumin a celkové bílkoviny byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže tyto zkoušky vynechat.

Zkouška totožnosti

Antigenní specifita se ověřuje při stanovení obsahu.

[7)] Referenční hemaglutinační antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

Zkoušky na čistotu

Virová inaktivace. 0,2 ml zkoušeného přípravku se vstříkne do alantoidní dutiny každého z deseti oplozených vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se smíchají. 0,2 ml směsného vzorku se vstříkne dalším deseti oplozeným vejcím a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru.

Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

Celkové bílkoviny. Nejvýše šestinásobek celkového obsahu hemaglutininu zjištěného ve Stanovení obsahu, ale nejvýše 100 μg bílkoviny na virový kmen v lidské dávce a nejvýše celkem 300 μg bílkoviny v lidské dávce.

Volný formaldehyd. Vyhovuje zkoušce na volný formaldehyd předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látka. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství.

Ovalbumin. Nejvýše 1 μg ovalbuminu v lidské dávce, stanoveno vhodnou metodou s použitím vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 100 m.j. endotoxinu v lidské dávce.

Stanovení obsahu

Obsah hemaglutinačního antigenu se stanoví imunodifuzí (*2.7.1*), porovnáním s hemaglutinačním referenčním antigenem nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního antigenu. Zkouška se provede při 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti (P = 0,95) této zkoušky je v rozmezí 80 % až 125 % zjištěného obsahu. Dolní mez spolehlivosti (P = 0,95) odhadu obsahu hemaglutinačního antigenu je nejméně 80 % množství deklarovaného v označení pro každý kmen.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích,
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použitých k přípravě vakcíny,
- metoda inaktivace,
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen na dávku,
- sezóna, v níž je vakcína určena k ochraně.

Vaccinum influenzae inactivatum ex virorum fragmentis praeparatum

Inaktivovaná vakcína proti chřipce (štěpený virion)

Je to sterilní vodná suspenze kmene nebo kmenů chřipkového viru typu A nebo B nebo směs kmenů obou typů. Virové kmeny se pěstují odděleně v kuřecích embryích, inaktivují se a ošetří tak, že se virové částice rozštěpí bez zmenšení antigenních vlastností antigenů hemaglutininu a neuraminidasy. Určené množství antigenu hemaglutininu každého kmene obsaženého ve vakcíně je 15 μg v dávce, pokud klinická situace nepodporuje použití jiného množství.

Vakcína je slabě opaleskující tekutina.

Výroba

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost pro humánní imunní séra a vakcíny (*2.6.9*).

Výběr vakcinačního kmene

Světová zdravotnická organizace vydává každý rok přehled světové epidemiologické situace, a je-li třeba, doporučuje nové kmeny odpovídající aktuální epidemiologické situaci. Tyto kmeny se použijí v souladu s platnými pravidly signatářských států Konvence o přípravě Evropského lékopisu. Nyní je obecnou praxí užívat vybrané kmeny mající vysoké výtěžky vhodných povrchových antigenů. Původ a průběh pasážování virových kmenů schvaluje oprávněná autorita.

Substrát pro pomnožení viru

Inokulum pro výrobu vakcíny se pomnoží v kuřecích embryích z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*), například kuřecích embryonálních fibroblastech nebo kuřecích ledvinných buňkách získaných z chovů kuřat prostých specifikovaných patogenů. Pro výrobu se virus každého kmene pěstuje v alantoidní dutině oplozených slepičích vajec ze zdravého chovu.

Virové inokulum

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Pracovní inokula jsou nejvýše patnáctou pasáží od schváleného vybraného kmene nebo od schváleného virového izolátu. Finální vakcínu představuje jedna pasáž z pracovního inokula. Pro potvrzení správnosti kmene chřipky se vhodnou metodou ověřuje hemaglutininový a neuramidasový antigen každého inokula. K přípravě monovalentní spojené sklizně se použije pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům.

Bakteriální a plísňová kontaminace. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*), na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Provede se zkouška na mykoplazmata; použije se 10 ml.

Pomnožování a sklizeň viru

Do inokula se může přidat protimikrobní látka. Po inkubaci v kontrolované teplotě se odebere alantoidní tekutina a smíchá se do monovalentní spojené sklizně. Protimikrobní látka se může přidat i v době odběru. V žádném stupni výroby se nepoužije penicilin ani streptomycin.

Monovalentní spojená sklizeň

K omezení možnosti kontaminace se inaktivace zahájí co nejdříve možno po přípravě. Virus se inaktivuje metodou, u které byla výrobcem na třech po sobě jdoucích šaržích prokázána stejná účinnost. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus chřipky bez zničení jeho antigenity; postup může změnit hemaglutinační a neuraminidasový antigen co nejméně. Inaktivační postup je prokazatelně schopný inaktivovat virus ptačí leukózy a mykoplazmata. Jestliže se monovalentní spojená sklizeň uchovává po inaktivaci, použije se teplota (5 ± 3) °C. Při použití formaldehydového roztoku nepřesahuje jeho koncentrace v žádné chvíli inaktivace 0,2 g/l; při použití beta-propiolaktonu jeho koncentrace nepřesahuje v žádné chvíli inaktivace 0,1 % (*V/V*).

Před nebo po inaktivačním postupu se monovalentní spojená sklizeň koncentruje a purifikuje vysokoobrátkovým odstřeďováním nebo jinou vhodnou metodou. Virové částice se rozštěpí schváleným postupem na subjednotkové složky. Pro každý nový kmen se provede validační zkouška, aby se dokázalo, že monovalentní spojená sklizeň sestává především z rozštěpených virových částic.

Jen taková monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

Hemaglutinační antigen. Obsah hemaglutinačního antigenu se stanoví imunodifuzí (*2.7.1*), porovnáním s referenčním antigenem[8)] nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního antigenu. Zkouška se provede při 20 °C až 25 °C.

Pro některé vakcíny fyzická forma částic hemaglutininu nedovoluje provést stanovení imunodifuze po inaktivaci viru. Pro tyto vakcíny se provádí stanovení hemaglutininu v monovalentní spojené sklizni před inaktivací. Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo vhodné zachování hemaglutinačního antigenu, a je použit vhodný traser například pro stanovení obsahu proteinu.

Neuraminidasový antigen. Přítomnost a typ neuraminidasového antigenu se ověří vhodnou enzymatickou nebo imunologickou metodou na prvních třech monovalentních spojených sklizních z každého pracovního inokula.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Virová inaktivace. Provedou se zkoušky popsané v odstavci Zkoušky na čistotu.

Chemikálie použité k rozštěpení. V monovalentní spojené sklizni se provádějí zkoušky na chemikálie užité pro rozštěpení, limity schvaluje oprávněná autorita.

Konečná várka vakcíny

Odpovídající množství monovalentních spojených sklizní se smíchá do konečné várky vakcíny. K přípravě šarže se může použít jen taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látka. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je nejméně 85 % a nejvýše 115 % zamýšleného množství.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu, na každou živnou půdu se použije 10 ml.

---

8) Referenční hemaglutinační antigen lze získat v National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Velká Británie.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci. K použití se může uvolnit jen taková šarže, která vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky na čistotu a Stanovení obsahu. Za předpokladu, že zkouška na virovou inaktivaci byla provedena s vyhovujícím výsledkem u každé monovalentní spojené sklizně a že zkoušky na volný formaldehyd, ovalbumin a celkové bílkoviny byly provedeny s vyhovujícím výsledkem v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže tyto zkoušky vynechat.

Zkouška totožnosti

Antigenní specifita se ověřuje při stanovení obsahu.

Zkoušky na čistotu

Virová inaktivace. 0,2 ml zkoušeného přípravku se vstříkne do alantoidní dutiny každého z deseti oplozených vajec a inkubuje se 3 dny při 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,5 ml alantoidní tekutiny a tekutiny se smíchají. 0,2 ml směsného vzorku se vstříkne dalším deseti oplozeným vejcím a inkubuje se 3 dny při teplotě 33 °C až 37 °C. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že přežije osm embryí z deseti. Z každého přežívajícího embrya se odebere 0,1 ml alantoidní tekutiny a s každou tekutinou se samostatně provede hemaglutinační zkouška na přítomnost živého viru.

Jestliže je v některé tekutině zjištěna hemaglutinace, provede se další pasáž na vejcích a zkouška hemaglutinace; nezjistí se žádná hemaglutinace.

Celkové bílkoviny. Nejvýše šestinásobek celkového obsahu hemaglutininu zjištěného ve Stanovení obsahu, ale nejvýše 100 μg bílkoviny na virový kmen v lidské dávce a nejvýše celkem 300 μg bílkoviny v lidské dávce.

Volný formaldehyd. Vyhovuje zkoušce na volný formaldehyd předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látka. Kde je to vhodné, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je nejméně minimální účinné množství a nejvýše 115 % deklarovaného množství.

Ovalbumin. Nejvýše 1 μg ovalbuminu v lidské dávce, stanoveno vhodnou metodou s použitím vhodného referenčního přípravku ovalbuminu.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 100 m.j. endotoxinu v lidské dávce.

Stanovení obsahu

Obsah hemaglutinačního antigenu se stanoví imunodifuzí (*2.7.1*), porovnáním s hemaglutinačním referenčním antigenem nebo s antigenem kalibrovaným podle referenčního antigenu. Zkouška se provede při 20 °C až 25 °C. Interval spolehlivosti (P = 0,95) této zkoušky je v rozmezí 80 % až 125 % zjištěného obsahu. Dolní mez spolehlivosti (P = 0,95) odhadu obsahu hemaglutinačního antigenu je nejméně 80 % množství deklarovaného v označení pro každý kmen.

U některých vakcín není možné kvantitativní stanovení hemaglutinačního antigenu vzhledem k dostupným referenčním přípravkům. Místo toho se provede vhodnými metodami imunologický důkaz hemaglutinačního antigenu a jeho semikvantitativní stanovení.

Uschovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- že vakcína byla připravena na vejcích,
- kmen nebo kmeny chřipkových virů použitých k přípravě vakcíny,
- metoda inaktivace,
- obsah hemaglutininu v mikrogramech na virový kmen na dávku,
- sezóna, v níž je vakcína určena k ochraně.

Vaccinum laryngotracheitidis infectivae aviariae vivum ad pullum

Živá vakcína proti ptačí infekční laryngotracheitidě pro kuřata

Je to přípravek z vhodného kmene viru ptačí infekční laryngotracheitidy.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Vakcinační virus se pomnoží na chorioalantoidních blanách kuřecích embryí pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo na vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Pokud se použijí buněčné kultury ptačího původu, pocházejí z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Vakcína obsahuje vhodné stabilizující látky a lyofilizuje se.

Výběr vakcinačního kmene

Kmen viru by měl prokazatelně odpovídat z hlediska nevratnosti virulence, indexu intratracheální virulence, bezpečnosti a imunogenity pro zvířata, jimž je určen. Pro průkaz bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít tyto zkoušky.

Nevratnost virulence. Kápnutím do oka se podá takové množství vakcinačního viru (např. deset dávek), které umožní maximální získání viru při dále popsaném pasážování na pěti dvoutýdenních vnímavých kuřatech z chovu prostého specifikovaných patogenů. Za 3 až 5 dnů se z mukózy vhodných částí dýchacího ústrojí jednotlivých kuřat připraví suspenze a vytvoří se směsný vzorek. Každému z pěti dalších kuřat stejného věku a původu se kápnutím do oka podá 0,1 ml směsné mukózní suspenze. Tento postup se provede pětkrát. V každé pasáži se potvrdí přítomnost viru. Jestliže se v některé úrovni pasáže virus nezjistí, provede se druhá série pasáží.

Stanoví se dále popsaný index intratracheální virulence použitím nepasážovaného viru a viru, který byl získán z nejvyšší pasáže. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže nejsou pozorovány známky zvýšení virulence u viru v nejvyšší pasáži ve srovnání s virem nepasážovaným.

Jestliže vakcinační virus nebyl získán v obou sériích pasáží, vyhovuje rovněž této zkoušce.

Index intratracheální virulence. Pro každý zkoušený virus se použije nejméně šedesát desetidenních vnímavých kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů. Kuřata se namátkově rozdělí do tří skupin, které se umístí a obsluhují odděleně. Připraví se dvě desetinásobná sériová ředění

suspenze viru o počátečním titru 10^5 EID_{50} nebo $CCID_{50}$ v 0,2 ml (nebo pro virus nabývající původní vlastnosti po maximálním pasážování, jak je popsáno výše. Jestliže tyto titry nemohou být dosaženy, použijí se nejvyšší dosažitelné titry). Neředěná virová suspenze a dvě ředění viru se přidělí různým skupinám kuřat. Každému kuřeti se podá intratracheálně 0,2 ml suspenze viru v koncentraci příslušející jeho skupině. Kuřata se pozorují 10 dnů a zaznamenává se počet uhynulých. Index intratracheální virulence je představován součtem počtu úhynů ve třech skupinách. Virový kmen je vyhovující, jestliže index intratracheální virulence není vyšší než 20.

Bezpečnost. Zkouška se provádí pro všechny způsoby podání uvedené v označení a na všech kategoriích kuřat, pro které je vakcína určena. U jednotlivých kategorií se použijí kuřata nejnižšího stáří.

Použije se nejméně dvacet vnímavých kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). U brojlerů se může zkouška provést na sérologicky negativních kuřatech, která nejsou SPF, za předpokladu, že jednou bude zkouška provedena na kuřatech jiné kategorie z chovu prostého specifikovaných patogenů. Každému kuřeti se podá vakcinační virus v množství nejméně desetinásobku nejvyššího titru, pravděpodobně obsaženém v jedné vakcinační dávce. Kuřata se pozorují 21 dnů. Vakcinační virus vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá neobvyklé příznaky nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcinačnímu viru.

Imunogenita. K průkazu imunogenity je vhodná zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti. Zkouška se provádí na kuřatech nejnižší věkové kategorie, pro kterou je vakcína určena.

Zkoušení šarže

Pokud byly zkoušky na viry aviární leukózy a cizí viry na buněčných kulturách a na kuřecích embryích provedeny s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, mohou být tyto zkoušky při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěny, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s vyhovujícím výsledkem na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Rekonstituovaná, a je-li třeba, i naředěná a monospecifickým sérem proti aviární infekční laryngotracheitidě neutralizovaná vakcína již dále neinfikuje chorioalantoidní membránu kuřecích embryí pocházejících z chovu prostých specifikovaných patogenů nebo citlivé buněčné kultury.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použije se nejméně deset vnímavých kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*), která mají nejnižší stáří uvedené v označení. Kápnutím do oka se každému kuřeti podá deset dávek vakcíny ve vhodném objemu. Kuřata se pozorují 21 dnů. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže během pozorovací doby uhynou nejvýše dvě kuřata z důvodů, které nelze přisuzovat vakcíně. Uhyne-li více kuřat, zkouška se opakuje. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže žádné kuře nemá výrazné klinické příznaky onemocnění nebo neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*). Je-li třeba, vakcína se nejprve naředí a potom neutralizuje monospecifickým sérem proti ptačí infekční laryngotracheitidě. Vyhovuje zkoušce na virus ptačí leukózy.

Cizí viry při použití buněčných kultur (*2.6.5*). Je-li třeba, vakcína se nejprve naředí a potom neutralizuje monospecifickým sérem proti ptačí infekční laryngotracheitidě. Vyhovuje zkoušce na cizí viry při použití buněčných kultur.

Cizí viry při použití kuřecích embryí (*2.6.3*). Je-li třeba, vakcína se nejprve naředí a potom neutralizuje monospecifickým sérem proti ptačí infekční laryngotracheitidě. Vyhovuje zkoušce na cizí viry při použití kuřecích embryí.

Cizí agens při použití kuřat (*2.6.6*). Vakcína vyhovuje zkoušce na cizí agens při použití kuřat. Vakcína rovněž vyhovuje zkoušce s fluorescenčními protilátkami nebo enzymové imunoanalýze (ELISA) na aviární retikuloendotelový virus a enzymové imunoanalýze (ELISA) na virus krůtí rhinotracheitidy, která se provede ze séra vakcinovaných kuřat.

Bakterie a houby. Provede se kvantitativní zkouška na bakterie a houby. Vakcína může obsahovat pouze jeden saprofytický mikroorganismus v jedné dávce a neobsahuje žádný patogenní mikroorganismus. Vakcíny určené k parenterálnímu podání spolu s příslušnou tekutinou vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Rekonstituovaná vakcína se titruje inokulací na chorioalantoidní membránu devítidenních až jedenáctidenních kuřecích embryí nebo na vhodné buněčné kultury. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá nejnižšímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použije se nejméně třicet vnímavých kuřat stejného původu z chovu prostého specifikovaných patogenů. Každému z nejméně dvaceti kuřat se podá jedna dávka vakcíny a nejméně deset kuřat slouží jako kontrola. Za 21 dnů se každé kuře intratracheálně čelenžuje dostatečným množstvím virulentního viru ptačí infekční laryngotracheitidy. Kuřata se pozorují 7 dnů po čelenži. Zaznamenají se úhyny, na konci pozorovací doby se provede postmortální vyšetření na makroskopické léze -- mukózní, hemoragický a pseudomembranózní zánět průdušnice a orbitálních sinů.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže nejméně 90 % kontrol uhyne nebo vykazuje průkazné makroskopické léze na průdušnici a v orbitálních sinech. V opačném případě se zkouška opakuje. Přípravek vyhovuje, jestliže nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežije a nemá makroskopické léze na průdušnici ani v orbitálních sinech.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccinum ad usum veterinarium*.

Vaccinum leptospirosis ad usum veterinarium

Vakcína proti leptospiróze pro veterinární použití

Je to inaktivovaná suspenze jednoho nebo více kmenů *Leptospira interrogans* sérovar *canicola* nebo *icterohaemorrhagiae* či směs obou sérovarů.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.* Leptospiry se kultivují ve vhodné živné půdě, která může obsahovat sérum. Z konečného výrobku se sérum odstraní. Na konci růstu se mikroorganismy zcela inaktivují fyzikálními nebo chemickými prostředky nebo jejich kombinací. Může se přidat adjuvans a přípravek se může též lyofilizovat.

Následující požadavky platí pro tekuté přípravky a pro lyofilizované přípravky po jejich rekonstituování podle návodu.

Zkouška totožnosti

Když se přípravek podá pokusným zvířatům, vyvolá tvorbu aglutinačních protilátek proti sérovaru nebo sérovarům použitým k jeho přípravě.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě zdravá zvířata toho druhu, pro který je přípravek určen a která jsou vnímavá k sérovaru či sérovarům použitým při výrobě přípravku. Sérum těchto zvířat neobsahuje aglutinační protilátky proti daným sérovarům. Každému zvířeti se doporučeným způsobem vstříkne dvojnásobek předepsané dávky pro psy uvedené v označení. Zvířata se pozorují 14 dní. Neprojeví se žádná výrazná místní ani systémová reakce.

Inaktivace. Zkouška na živé leptospiry se provede naočkováním do specifické živné půdy. Jeden mililitr zkoušeného přípravku se naočkuje do 100 ml živné půdy. Půda se inkubuje 14 dní při 30 °C, poté se vyočkuje do dalšího množství živné půdy a obě půdy se inkubují 14 dní při 30 °C; v žádné půdě se neobjeví růst leptospir. Současně se provede kontrolní zkouška naočkováním zkoušeného přípravku s kulturou leptospir do dalšího množství živné půdy. Inkubuje se 14 dní při 30 °C; během 14 dní se projeví růst leptospir.

Sérum. Pokud se během výroby přípravku použilo sérum, provede se sérum-precipitační zkouška, kterou se prokáže nepřítomnost séra v konečné várce.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Pěti křečkům ze stejného chovu nejvýše 3 měsíce starým se podkožně vstříkne po 1/40 dávky uvedené v označení pro psy. Za 15 až 20 dní se intraperitoneálně vstříkne vakcinovaným zvířatům i nevakcinovaným kontrolám, které tvoří 5 křečků ze stejného chovu, v přiměřeném množství virulentní kultura leptospir sérovaru obsaženého ve vakcíně nebo suspenze jaterní či ledvinové tkáně zvířat infikovaných leptospirami shodného sérovaru. Jestliže se použily k výrobě vakcíny *L. interrogans* sérovar *canicola* i serovar *icterohaemorrhagiae*, provádí se zkouška účinnosti pro každý sérovar zvlášť. Během 14 dní po čelenži uhynou nejméně 4 kontrolní zvířata za příznaků

leptospirózy. Vakcinovaná zvířata se pozorují ještě 14 dní po úhynu kontrolních zvířat a nejméně 4 z nich přežijí v dobrém zdraví.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení obalu se uvede:
- sérovar nebo sérovary použité při výrobě,
- zda bylo při výrobě použito sérum.

Vaccinum meningococcale polysaccharidicum

Polysacharidová vakcína proti meningokokům

Je to lyofilizovaný přípravek jednoho nebo více purifikovaných kapsulárních polysacharidů získaných z jednoho nebo více vhodných kmenů *Neisseria meningitidis* skupiny A, C, Y a W 135, které jsou schopny trvale vytvářet polysacharidy.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny A tvoří opakující se jednotky částečně O-acetylovaného N-acetylmanosaminu spojené 1alfa 6 fosfodiesterovými vazbami.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny C tvoří opakující se jednotky částečně O-acetylované kyseliny sialové spojené 2alfa 9 glykosidickými vazbami.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny Y tvoří střídající se jednotky částečně O-acetylované kyseliny sialové a D-glukosy spojené 2alfa 6 a 1alfa 4 glykosidickými vazbami.

Polysacharid *N. meningitidis* skupiny W 135 tvoří střídající se jednotky částečně O-acetylované kyseliny sialové a D-galaktosy spojené 2alfa 6 a 1alfa 4 glykosidickými vazbami.

Polysacharidová složka nebo složky uvedené v označení na obalu tvoří společně s ionty vápníku a zbytkovou vlhkostí více než 90 % hmotnosti přípravku.

Zkoušený přípravek vyhovuje článku *Vaccina ad usum humanum.*

Výroba

Výroba je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup prokazatelně poskytuje homogenní přípravek s dostatečnou imunogenitou a bezpečností pro člověka.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a humánních vakcín (*2.6.9*).

Inokula

Kmeny *N. meningitidis* použité na matečná inokula se určí podle vývojových záznamů, které obsahují informace o jejich původu a jejich biochemických a sérologických charakteristikách.

Kultury z pracovního inokula mají stejné charakteristiky jako kmen použitý k přípravě matečného inokula. Kmeny mají následující charakteristiky:
- kolonie získané z kultury jsou kruhovité, jednotného tvaru a lesku s mukózním, opalescentním a našedlým vzhledem,

- barvení podle Grama ukazuje charakteristické gramnegativní diplokoky v uspořádání kávových zrn,
- oxidasová zkouška je pozitivní,
- kultury utilizují glukosu a maltosu,
- suspenze kultur jsou vhodnými specifickými antiséry aglutinovány.

Růst a sklizeň

Pracovní inokula se pěstují na pevných půdách neobsahujících substance krevních skupin ani látky savčího původu. Inokulum může pocházet z jedné nebo více subkultivací v tekuté živné půdě před tím, než bylo použito k inokulaci konečné živné půdy. Použité tekuté půdy a konečná živná půda jsou semisyntetické a prosty látek srážených cetrimoniumbromidem (hexadecyltrimethylamoniumbromid) a neobsahují substance krevních skupin ani vysokomolekulární polysacharidy.

Bakteriální čistota kultury se ověřuje mikroskopickým vyšetřením nátěrů barvených podle Grama a naočkováním do vhodných půd; několik polí se pozoruje při velkém zvětšení tak, aby se vyšetřilo nejméně 10 000 organismů.

Kultury se odstředí a z tekutiny se polysacharidy vysrážejí přidáním cetrimoniumbromidu. Získaná sraženina se oddělí a může se uchovávat před další purifikací při -20 °C.

Purifikované polysacharidy

Po rozštěpení komplexu polysacharidů a cetrimoniumbromidu se polysacharidy purifikují za použití vhodných postupů k odstranění zbylých nukleových kyselin, bílkovin a lipopolysacharidů.

Posledním purifikačním stupněm je srážení polysacharidů ethanolem. Ty se potom vysuší a uchovávají při -20 °C. Ztráta sušením se stanoví termogravimetricky (*2.2.34*) a získaná hodnota se použije k přepočtu jiných chemických výsledků zkoušek na vysušenou látku.

K přípravě konečné várky vakcíny se mohou použít pouze takové purifikované polysacharidy, které vyhovují následujícím požadavkům.

Bílkoviny (*2.5.16*). Nejvýše 10 mg bílkovin v gramu purifikovaného polysacharidu, přepočteno na vysušenou látku.

Nukleové kyseliny (*2.5.17*). Nejvýše 10 mg nukleových kyselin v gramu purifikovaného polysacharidu, přepočteno na vysušenou látku.

O-acetyl skupiny (*2.5.19*). Nejvýše 2 mmol O-acetyl skupin v gramu purifikovaných polysacharidů skupiny A, nejvýše 1,5 mmol v gramu polysacharidu skupiny C, nejvýše 0,3 mmol v gramu polysacharidu skupin Y a W135, to vše přepočteno na vysušenou látku.

Fosfor (*2.5.18*). Nejvýše 80 mg fosforu v gramu purifikovaného polysacharidu skupiny A, přepočteno na vysušenou látku.

Kyselina sialová (*2.5.23*). Nejvýše 800 mg kyseliny sialové v gramu polysacharidu skupiny C a nejvýše 560 mg kyseliny sialové v gramu purifikovaného polysacharidu skupiny Y a W135, to vše přepočteno na vysušenou látku. Použijí se tyto porovnávací roztoky:
Polysacharid skupiny C: roztok *kyseliny N-acetylneuraminové R* (150 mg/l),
Polysacharid skupiny Y: roztok obsahující *kyselinu N-acetylneuraminovou R* (95 mg/l) a *glukosu R* (55 mg/l),
Polysacharid skupiny W135: roztok obsahující *kyselinu N-acetylneuraminovou* (95 mg/l) a *galaktosu R* (55 mg/l).

Vápník. Jestliže byly při purifikaci použity vápenaté soli, provede se stanovení vápníku, jehož obsah bude v rozmezí schváleném pro výrobek.

Rozdělení velikosti molekul. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*) s použitím *agarosy pro chromatografii R* nebo *agarosy síťované pro chromatografii R*. Použije se kolona délky asi 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm, jejíž rovnováha byla ustavena rozpouštědlem s iontovou silou 0,2 mol/kg a hodnotou pH 7,0 až 7,5. Na kolonu se nanese 2,5 mg polysacharidu v objemu asi 1,5 ml a eluuje se asi 20 ml/h. Odebírají se frakce asi po 2,5 ml a obsah polysacharidu se stanoví vhodnou metodou.

Před dosažením distribučního koeficientu (K_D) 0,50 se eluuje nejméně 65 % polysacharidu skupiny A, 75 % polysacharidu skupiny C, 80 % polysacharidu skupiny Y a 80 % polysacharidu skupiny W135. Mimo to jsou procenta eluovaná před dosažením tohoto distribučního koeficientu v rozmezích schválených pro jednotlivé výrobky.

Totožnost a sérologická specificita. Totožnost a sérologická specificita se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*). Potvrdí se totožnost a čistota každého polysacharidu a dokáže se, že obsah polysacharidu heterologní skupiny *N. meningitidis* nepřesahuje 1 %.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Polysacharid vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne 1 ml roztoku obsahujícího 0,025 μg purifikovaného polysacharidu v mililitru.

Konečná várka vakcíny

Jeden nebo více polysacharidů jedné nebo více skupin *N. meningitidis* se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, které může obsahovat stabilizátor. Když se úplně rozpustí, zfiltruje se roztok filtrem zadržujícím bakterie.

K přípravě šarže se může použít jen taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku.

Sterilita (*2.6.1*). Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu, při níž se na každou živnou půdu použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozdělí do sterilních obalů. Obaly se pak uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

Do spotřeby se může uvolnit jen taková šarže, která vyhovuje všem požadavkům, předepsaným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti.

Vlastnosti

Bílý nebo krémově zbarvený prášek nebo tablety snadno rozpustné ve vodě.

Zkouška totožnosti

Každý polysacharid obsažený ve vakcíně se dokáže vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Zkoušky na čistotu

Rozdělení velikosti molekul. Provede se vylučovací chromatografie (*2.2.30*). Použije se kolona délky asi 0,9 m a vnitřního průměru 16 mm, jejíž rovnováha byla ustavena rozpouštědlem s iontovou silou 0,2 mol/kg a hodnotou pH 7,0 až 7,5. Na kolonu se nanese 2,5 mg polysacharidu v objemu asi 1,5 ml a eluuje se asi 20 ml/h. Odebírají se frakce asi po 2,5 ml a obsah polysacharidu se stanoví vhodnou metodou.

Pro bivalentní vakcínu (skupina A + skupina C) se použije *agarosa síťovaná pro chromatografii R.* Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže:
- 65 % polysacharidu skupiny A se eluuje před K_D = 0,50,
- 75 % polysacharidu skupiny C se eluuje před K_D = 0,50.

Pro tetravalentní vakcínu (skupina A + skupina C + skupina Y + skupina W135) se použije *agarosa síťovaná pro chromatografii R1* a aplikuje se vhodná imunochemická metoda (*2.7.1*), aby se zajistily eluční podmínky pro různé polysacharidy. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže K_D pro hlavní pík je:
- nejvýše 0,70 pro polysacharid skupiny A a skupiny C,
- nejvýše 0,57 pro polysacharid skupiny Y,
- nejvýše 0,68 pro polysacharid skupiny W 135.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne nitrožilně 1 ml roztoku obsahujícího:
- 0,025 μg polysacharidu monovalentní vakcíny,
- 0,050 μg polysacharidu bivalentní vakcíny,
- 0,10 μg polysacharidu tetravalentní vakcíny.

Stanovení obsahu

Provede se stanovení každého polysacharidu obsaženého ve vakcíně.

Pro bivalentní vakcínu (skupina A a skupina C) se použije měření obsahu fosforu (*2.5.18*) ke stanovení obsahu polysacharidu A a měření obsahu kyseliny sialové (*2.5.23*) ke stanovení obsahu polysacharidu C. Ke stanovení kyseliny sialové se jako referenční roztok použije roztok *kyseliny N-acetylneuraminové R* (150 mg/l).

Pro tetravalentní vakcínu (skupina A + skupina C + skupina Y + skupina W 135) se použije vhodná imunochemická metoda (*2.7.1*) s referenčním přípravkem purifikovaného polysacharidu pro každou skupinu.

Vakcína obsahuje 70 % až 130 % množství každého polysacharidu uvedeného v označení.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:
- skupina nebo skupiny polysacharidů (A, C, Y nebo W135) obsažené ve vakcíně,
- počet mikrogramů polysacharidu v lidské dávce.

Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti Aujeszkého nemoci prasat

Je to suspenze vhodného kmene viru Aujeszkého nemoci inaktivovaného bez ovlivnění imunogenních vlastností nebo suspenze inaktivované frakce viru mající odpovídající imunogenní vlastnosti.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Virový kmen se pomnoží ve vhodné buněčné kultuře (*5.2.4*). Virová suspenze se sklidí a inaktivuje; mohou se připravit částice virů, které se purifikují a koncentrují.

Zkouška na zbylý infekční virus Aujeszkého nemoci se provádí na sklizené várce každé šarže a používá se přitom dvou pasáží na stejném typu buněčné kultury, jaký byl použit při výrobě vakcíny, a tím se potvrdí účinná inaktivace. Množství inaktivovaného viru používaného ve zkoušce odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny. Nezjistí se živý virus. Může se přidat vhodné adjuvans a protimikrobní konzervační látky. Vakcína může být lyofilizovaná.

Výběr vakcinačního kmene

K přípravě vakcíny se může použít jen takový virový kmen, který je prokazatelně uspokojivý z hlediska bezpečnosti a imunogenity. Mohou se použít následující zkoušky k důkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*).

Bezpečnost.

A. Zkouška se provádí u všech kategorií zvířat, pro které je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Použitá zvířata musí být prosta protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Dvě dávky vakcíny se předepsaným způsobem podají nejméně deseti zvířatům. Po 14 dnech se každému zvířeti vstříkne jedna dávka vakcíny a zvířata se pozorují dalších 14 dnů. V průběhu 28 dnů zkoušky nevzniknou žádné abnormální místní či systémové reakce.

B. U zvířat použitých ve zkoušce imunogenity se také hodnotí bezpečnost kmene. U každého vakcinovaného zvířete se měří rektální teplota v době vakcinace, za 24 h a 48 h po ní. Nezjistí se signifikantní vliv na tělesnou teplotu, ani jiné systémové reakce (např. anorexie). Při porážce se místo podání vyšetří na místní reakci. Nevzniknou významné místní reakce.

C. Zvířata používaná na terénní zkoušky se také používají k hodnocení bezpečnosti. Použitá zvířata nemají protilátky proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Zkouška se provádí u všech kategorií zvířat, pro které je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Vytvoří se nejméně tři skupiny o dvaceti zvířatech s odpovídajícími kontrolními skupinami o nejméně deseti zvířatech. Tělesná teplota se měří všem zvířatům v době vakcinace, 24 h a 48 h po vakcinaci. Nezjistí se významný vliv na tělesnou teplotu. Při porážce se místo podání vyšetří na místní reakci. Nevzniknou významné místní reakce.

Imunogenita. Použije se nejméně deset výkrmových prasat ve stáří vhodném k vakcinaci prostých protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo frakcím viru. Tělesná hmotnost prasat se neliší od průměru skupiny o více než 20 %. Každé prase se očkuje podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem. Pět podobných prasat se ponechá jako kontrola. Na konci výkrmového období (80 kg až 100 kg) se každé prase zváží a provede se čelenž intranazálním podáním vhodného množství virulentního kmene viru Aujeszkého nemoci. Každé zvíře se zváží 7 dní po čelenži, nebo v době úhynu, jestliže k němu dojde dříve, a dosažený denní průměr se vypočítá v procentech. Pro

každou skupinu (vakcinovanou i kontrolu) se vypočítá průměr z denních průměrných přírůstků. Přípravek vyhovuje zkoušce, jestliže vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi denními průměrnými přírůstky v obou skupinách je nejméně 1,5. Zkoušku lze hodnotit jedině v případě, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky onemocnění Aujeszkého nemocí a průměr jejich denních přírůstků je méně než -0,5.

Jestliže je vakcína určena pro prasnice k pasivní ochraně selat, může se vhodnost kmene pro tento účel prokázat následující metodou. Osm prasnic bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci se vakcinuje podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem; čtyři prasnice se ponechají jako kontrola. Selata od těchto prasnic se ve stáří 7 dní čelenžují vhodným množstvím virulentního kmene viru Aujeszkého nemoci. Selata se pozorují 21 dní. Vakcína je vyhovující, jestliže u selat od vakcinovaných prasnic je nejméně 80% ochrana před úhynem v porovnání s kontrolní skupinou. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže každý vrh má nejméně osm selat.

Zkoušení šarže

Jestliže se s uspokojivým výsledkem provedla zkouška účinnosti na prasatech s reprezentativní šarží vakcíny, ale s použitím skupin o deseti prasatech místo pěti, může se tato zkouška u výrobce po schválení oprávněnou autoritou nahradit jako běžná zkouška jiných šarží vakcíny připravených ze stejného inokula alternativní zkouškou, pro kterou byla dostatečná korelace výsledků s lékopisnou metodou potvrzena statistickým hodnocením.

Zkouška totožnosti

U zvířat bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci zkoušený přípravek povzbudí tvorbu specifických protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci použité pro výrobu vakcíny.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Nejméně třem selatům v minimálním stáří pro vakcinaci se vstříknou dvě dávky vakcíny předepsaným způsobem. Zvířata jsou bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Zvířata se pozorují 14 dní a potom se každému vstříkne jedna dávka vakcíny. Pozorují se dalších 14 dní. V průběhu 28 dní zkoušky se nezjistí abnormální místní nebo systémové reakce.

Inaktivace. Pokud možno, provede se vhodná zkouška na zbylý infekční virus Aujeszkého nemoci s použitím dvou pasáží na stejné buněčné kultuře, jaká byla použita při přípravě vakcíny. Jinak se vstříkne po jedné dávce vakcíny podkožně pěti králíkům, kteří se pozorují 14 dní po podání. Nezjistí se výzkyt abnormálních reakcí (zejména místní vyrážka). Jestliže vakcinační virus není patogenní pro králíky, provede se zkouška na dvou ovcích.

Cizí virus. U selat použitých pro zkoušku bezpečnosti se provede zkouška na protilátky. Vakcína nepodporuje tvorbu protilátek proti jinému viru než proti viru Aujeszkého nemoci, proti virům patogenním pro prasata nebo proti virům, které by mohly překážet diagnóze infekčních onemocnění prasat (včetně virů ze skupiny pestivirů).

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Použije se nejméně pět prasat o hmotnosti 15 kg až 35 kg prostých protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Živá hmotnost žádného z prasat se neliší o více než 25 % od

průměrné hmotnosti ve skupině. Každému praseti se podá předepsaným způsobem jedna dávka vakcíny. Pět podobných prasat se použije jako kontrola. Za tři týdny se prasata jednotlivě zváží a provede se intranazálně čelenž vhodným množstvím virulentního kmene viru Aujeszkého nemoci. Každé zvíře se zváží 7 dní po čelenži nebo v době úhynu, jestliže k němu dochází dříve, a vypočítá se průměrný denní přírůstek v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolní) se vypočítá průměrný denní přírůstek v procentech. Vakcína vyhovuje, jestliže vakcinovaná prasata přežijí a rozdíly mezi průměry denních přírůstků v obou skupinách jsou nejméně 1,1. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky Aujeszkého nemoci a průměr jejich denních přírůstků dosahuje méně než -0,5.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede:

- zda je vakcinační kmen patogenní pro králíky,
- zda je vakcína z celého viru nebo subjednotková.

Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem vivum cryodesiccatum ad usum parenterale

Lyofilizovaná živá vakcína proti Aujeszkého nemoci prasat pro parenterální podání

Je to přípravek z oslabeného kmene viru Aujeszkého nemoci. Může se podávat po smíchání s adjuvans.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Virový kmen se pěstuje na vnímavé buněčné kultuře (*5.2.4*) nebo na kuřecích embryích z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Virová suspenze se sklidí, smíchá s vhodnou stabilizující tekutinou a lyofilizuje se.

Výběr vakcinačního kmene

K přípravě vakcíny se může použít pouze takový virový kmen, který prokazatelně odpovídá následující charakteristice: bezpečný; přenosný včetně přechodu přes placentu a přenosný semenem; nevratně oslabený a imunogenní. Kmen může mít genetické markery. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky:

Bezpečnost.

A. Deseti selatům ve stáří 3 až 4 týdny, které nemají protilátky proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci, se určeným způsobem podá množství viru, které odpovídá deseti dávkám vakcíny. Deset selat z téhož zdroje a stejného stáří, které nemají protilátky proti viru Aujeszkého nemoci

nebo jeho frakci, se ponechá jako kontrola. Zvířata se pozorují po dobu 21 dní. Zvířata zůstávají zdravá a křivka hmotnosti vakcinovaných selat se neliší od křivky selat kontrolních.

B. U zvířat použitých ve zkoušce na imunogenity se také hodnotí bezpečnost kmene. Rektální teplota se u každého vakcinovaného zvířete měří v době vakcinace, za 24 h a 48 h po ní. Nezjistí se signifikantní vliv na tělesnou teplotu, ani jiné systémové reakce (např. anorexie). Při porážce se místo podání vyšetří na místní reakci. Nevzniknou významné místní reakce.

C. Zvířata používaná na terénní zkoušky se také používají k hodnocení bezpečnosti. Použitá zvířata nemají protilátky proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Zkouška se provádí u všech kategorií zvířat, pro které je vakcína určena (prasnice, výkrmová prasata). Vytvoří se nejméně tři skupiny o dvaceti zvířatech s odpovídajícími kontrolními skupinami o nejméně deseti zvířatech. Tělesná teplota se měří všem zvířatům v době vakcinace, 24 h a 48 h po vakcinaci. Nezjistí se významný vliv na tělesnou teplotu. Při porážce se místo podání vyšetří na místní reakci. Nevzniknou významné místní reakce.

D. Deseti selatům ve stáří 3 až 5 dní, která jsou prosta protilátek viru proti Aujeszkého nemoci nebo jeho frakcím, se intranazálně podá množství viru, které odpovídá deseti dávkám vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Žádné sele neuhyne ani se neprojeví neurologické poruchy, jež by se mohly přisoudit vakcinačnímu viru.

E. Pěti selatům ve stáří 3 až 5 dnů se intracerebrálně vstříkne jedna dávka vakcíny. Žádné sele neuhyne ani se neobjeví neurologické poruchy.

F. Pět dní se denně deseti selatům ve stáří 3 až 4 týdny bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci podávají 2 mg prednisolonu na kilogram tělesné hmotnosti. Třetí den se každému seleti určeným způsobem podá takové množství viru, které odpovídá jedné dávce vakcíny. Protimikrobní látky se mohou podat, aby se předešlo nespecifickým příznakům. Zvířata se pozorují 21 dní po podání viru. Selata zůstávají zdravá.

G. Použije se patnáct březích prasnic bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Pěti prasnicím se určeným způsobem podá množství viru, které odpovídá deseti dávkám vakcíny, ve 4. až 5. týdnu březosti. Dalším pěti prasnicím se stejným způsobem podá stejné množství viru v 10. až 11. týdnu březosti. Dalších pět březích prasnic se použije jako kontrola. Počet narozených selat od vakcinovaných prasnic, jakékoliv abnormality u selat a délka březosti se významně neliší od prasnic kontrolních. Od selat narozených od vakcinovaných prasnic se neizoluje virus Aujeszkého nemoci, ani se nezjistí protilátky proti viru Aujeszkého nemoci před napitím kolostra.

Šíření v těle. Použije se osmnáct prasat ve stáří 3 až 4 týdny bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Čtrnácti prasatům se podá jedna dávka vakcíny doporučeným způsobem na doporučené místo. Skupiny po dvou vakcinovaných prasatech se porážejí za 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 120 h po vakcinaci. Zbývající dvě skupiny po dvou prasatech slouží jako kontrola a porazí se za 6 h a 120 h. Provedou se odděleně vhodné citlivé zkoušky na virus z následujících tkání a sekretů: tonzily, nosní sliznice, plíce, aplikační místo, satelitní lymfatické uzliny, slezina, mozková tkáň, výkaly a sliny. Vakcína je přijatelná, pokud virus není zjištěn v sekretech, výkalech, nosní sliznici, plicích a mozkové tkáni.

Infekčnost. Zkouška se provede čtyřikrát nezávisle na sobě. Pokaždé se použijí čtyři selata ve stáří 3 až 4 týdny bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Každému seleti se určeným způsobem podá množství viru odpovídající jedné dávce vakcíny. Jeden den po podání vakcíny se do těsné blízkosti vakcinovaných selat dají selata nevakcinovaná stejného stáří a bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Za pět týdnů se všechna zvířata testují

na přítomnost protilátek proti viru Aujeszkého nemoci. Protilátky proti viru Aujeszkého nemoci se nezjistí v žádné skupině kontaktních kontrol. U všech naočkovaných selat se protilátky prokážou.

Nevratnost oslabení. Dvěma selatům ve stáří 3 až 5 dní, která nemají protilátky proti viru Aujeszkého nemoci ani frakci viru, se intranazálně podá množství viru, které odpovídá jedné dávce vakcíny. Za tři až pět dnů se odeberou od každého selete vzorky mozku, plic, tonzil a místních lymfatických uzlin a vzorky se smíchají. Jeden mililitr smíchané orgánové suspenze se podá intranazálně dalším dvěma selatům stejného stáří a vnímavosti. Tato operace se opakuje nejméně devětkrát, naposledy na nejméně pěti selatech. Přítomnost viru se ověřuje v každé pasáži přímým nebo nepřímým způsobem. Jestliže virus zmizí, provede se druhá série pasáží. Selata nehynou a ani nevykazují neurologické poruchy, jež by se mohly přičíst vakcinačnímu viru. V porovnání s nepasážovaným virem nejsou známky zvýšení virulence.

Imunogenita. Použije se nejméně deset výkrmových prasat ve stáří doporučeném k vakcinaci, která jsou prosta protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Tělesná hmotnost se u prasat neliší od průměrné hmotnosti skupiny o více než 20 %. Každé prase se vakcinuje podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem. Pět podobných prasat se použije jako kontrola. Na konci výkrmového období (80 kg až 100 kg) se prasata zváží a provede se čelenž intranazálním podáním vhodného virulentního kmene viru Aujeszkého nemoci. Každé zvíře se 7 dní po čelenži nebo v době úhynu, jestliže k němu dojde dříve, zváží a vypočítá se denní průměrný přírůstek v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolu) se vypočítá průměr z denních průměrných přírůstků. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže všechna vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi průměry denních přírůstků obou skupin je nejméně 1,5. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechna kontrolní prasata vykazují příznaky onemocnění Aujeszkého nemoci a průměr jejich denních přírůstků je méně než -0,5.

Jestliže je vakcína určena k použití u prasnic k pasivní ochraně selat, může se vhodnost kmene pro tento účel prokázat následující metodou. Osm prasnic prostých protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci se vakcinuje podle doporučeného schématu a doporučeným způsobem; čtyři prasnice se použijí jako kontrola. Selata od těchto prasnic se čelenžují vhodným množstvím virulentního viru Aujeszkého nemoci ve věku 7 dní a pozorují se 21 dní. Vakcína je uspokojivá, jestliže selata od vakcinovaných prasnic jsou v porovnání s kontrolní skupinou nejméně z 80 % chráněna oproti mortalitě. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže každý vrh selat má nejméně osm selat.

Zkoušení šarže

Jestliže byla zkouška na účinnost u prasat provedena s vyhovujícím výsledkem u reprezentativní dávky vakcíny, pak tato zkouška za souhlasu oprávněné autority může být opomenuta výrobcem při provádění pravidelné kontroly u dalších šarží vakcíny připravených z téhož inokula.

Zkouška totožnosti

U zvířat bez protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo frakcím viru zkoušený přípravek povzbudí tvorbu specifických neutralizujících protilátek.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Deset dávek vakcíny se podá způsobem uvedeným v označení nejméně třem selatům ve stáří 3 až 4 týdny, která jsou prostá protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Tři selata stejného stáří prosta protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci se použijí jako kontrola. Zvířata se pozorují 14 dní. Nezjistí se abnormální místní nebo systémové reakce. Křivka hmotnosti vakcinovaných selat se neliší od křivky selat kontrolních.

Cizí viry. Vakcína se neutralizuje monospecifickým antisérem a naočkuje se na buněčnou kulturu vnímavou k viru patogennímu pro prasata. Kultura se udržuje 14 dní a v průběhu této doby se provede nejméně jedna pasáž. Nevyvíjí se cytopatický efekt; buňky nevykazují přítomnost hemadsorpčního agens; tekutina z kultury je prosta hemaglutinačních agens.

U selat použitých pro zkoušku bezpečnosti se provede zkouška na protilátky proti virům ze skupiny pestivirů. Vakcína nevyvolá tvorbu takových protilátek.

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Titr viru. Rekonstituovaná vakcína se titruje na buněčné kultuře nebo inokulací do alantoidní dutiny kuřecích embryí. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá minimálnímu titru viru, který je uveden v označení.

Stanovení účinnosti

Zkouška účinnosti se provede každým způsobem podání, který je uveden v označení. Použije se nejméně pět prasat o hmotnosti 15 kg až 35 kg prostých protilátek proti viru Aujeszkého nemoci nebo jeho frakci. Hmotnost žádného prasete se neliší o více než 25 % od průměrné hmotnosti ve skupině. Každému praseti se podá způsobem uvedeným v označení jedna dávka vakcíny. Pět podobných prasat se použije jako kontrola. Za tři týdny se provede u každého prasete intranazálně čelenž vhodným množstvím virulentního kmene viru Aujeszkého nemoci. Každé zvíře se zváží 7 dní po čelenži nebo v době úhynu, jestliže k němu dojde dříve, a vypočítá se průměrný denní přírůstek v procentech. Pro každou skupinu (vakcinovanou i kontrolní) se vypočítá průměr denních průměrných přírůstků. Vakcína vyhovuje, jestliže vakcinovaná prasata přežijí a rozdíl mezi průměry denních přírůstků v skupinách není menší než 1,6. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže všechna kontrolní prasata mají příznaky onemocnění Aujeszkého nemoci a průměr jejich denních přírůstků je méně než -0,5.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum morbi Carrei vivum cryodesiccatum pro cane

Živá vakcína proti psince lyofilizovaná

Je to přípravek z kmene viru psinky, který je oslaben pro psy.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Oslabený kmen se pomnoží ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*) nebo kuřecích embryích získaných ze zdravých chovů (*5.2.2*).

Výběr vakcinačního kmene

Pouze virový kmen prokazatelně odpovídající z hlediska oslabení a imunogenity se může použít k přípravě vakcíny. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Oslabení. Objem virové suspenze odpovídající polovině dávky vakcíny, nebo jestliže tento objem obsahuje méně než 500 $CCID_{50}$ nebo 500 EID_{50}, množství, které obsahuje 500 $CCID_{50}$, či 500 EID_{50}, se intracerebrálně vstříkne každému ze dvou vnímavých štěnat ve stáří 8 až 16 týdnů. Během 21 dní tato dávka nevyvolává patogenní efekt.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k průkazu imunogenity virového kmene.

Zkoušení šarže

Pokud je stanovení účinnosti provedeno s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží připravených z téhož inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Vakcína rekonstituovaná podle pokynů v označení a smíchaná s monospecifickým psinkovým antisérem nevyvolá již cytopatický efekt ve vnímavé buněčné kultuře nebo poškození chorioalantoidní membrány kuřecích embryí starých 9 dní až 11 dní.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým štěnatům starým 8 až 16 týdnů a prostým psinkových virusneutralizačních protilátek se vstříkne po dvojnásobku dávky rekonstituované vakcíny způsobem uvedeným v označení. Zvířata se pozorují 21 dní. Zvířata zůstávají zdravá bez významných místních či systémových reakcí.

Cizí viry.

A. Rekonstituovaná vakcína se smíchá s monospecifickým psinkových antisérem. Na vnímavé buněčné kultuře nevyvolá cytopatický efekt, ani nejeví známky přítomnosti hemaglutinačních nebo hemadsorpčních agens.

B. Zkouška se provede na myších hmotnosti 11 g až 15 g. Každé myši se intracerebrálně vstříkne 0,03 ml rekonstituované vakcíny. Použije se nejméně deset myší, avšak takový počet, který umožní podat 3/10 dávky vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Pokud uhyne více než dvě myši během prvních 48 h, zkouška se opakuje. Od třetího do dvacátého prvního dne od podání nevykazují myši abnormality, které by bylo možné přisoudit vakcíně.

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Titr rekonstituované vakcíny se stanoví na vhodných buněčných kulturách nebo kuřecích embryích 9 dní až 11 dní starých. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně množství viru odpovídající minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použije se sedm vnímavých štěnat 8 až 16 týdnů starých prostých psinkových virusneutralizačních protilátek. Způsobem uvedeným v označení se každému z pěti zvířat podá objem rekonstituované vakcíny obsahující množství viru, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení. Další dvě zvířata se ponechají jako kontrola. Všechna zvířata se pozorují 21 dní. Po uplynutí této doby se všem zvířatům intravenózně vstříkne takové množství psinkového viru, které je schopné vyvolat u vnímavých psů onemocnění s typickými příznaky nebo úhyn. Zvířata se pozorují dalších 21 dní. Zvířata vakcinovaná zůstávají zdravá bez příznaků onemocnění. Kontrolní zvířata uhynou na psinku nebo se projeví typické příznaky vážného infekčního onemocnění. Jestliže jedno z kontrolních štěňat nemá žádné příznaky onemocnění, zkouška se opakuje.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum morbi Carrei vivum cryodesiccatum pro mustelidis

Živá vakcína proti psince lasičkovitých lyofilizovaná

Je to přípravek z kmene viru psinky, který je oslaben pro fretky.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Oslabený kmen se pomnoží ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*) nebo kuřecích embryích, v obou případech získaných od zdravých zvířat.

Výběr vakcinačního kmene

Pouze virový kmen prokazatelně odpovídající z hlediska oslabení a imunogenity se může použít k přípravě vakcíny. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Oslabení. Když se objem virové suspenze odpovídající pěti dávkám vakcíny intramuskulárně vstříkne každé ze dvou vnímavých fretek, nevyvolá během 21 dní patogenní efekty.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k průkazu imunogenity virového kmene.

Zkoušení šarže

Pokud je stanovení účinnosti provedeno s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží připravených z téhož inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Vakcína rekonstituovaná podle pokynů v označení a smíchaná s psinkovým antisérem nevyvolá již cytopatické efekty ve vnímavých buněčných kulturách nebo poškození chorioalantoidních membrán kuřecích embryí starých 9 dní až 11 dní.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým fretkám prostým psinkových virusneutralizačních protilátek se vstříkne po dvojnásobku dávky rekonstituované vakcíny způsobem uvedeným v označení. Zvířata se pozorují 21 dní. Zvířata zůstávají zdravá bez významných místních či systémových reakcí.

Cizí viry.

A. Rekonstituovaná vakcína se smíchá s monospecifickým antisérem. Na vnímavých buněčných kulturách již nevyvolá cytopatický efekt ani nejeví známky přítomnosti hemaglutinačních a hemadsorpčních agens.

B. Zkouška se provede na myších hmotnosti 11 g až 15 g. Každé myši se intracerebrálně vstříkne 0,03 ml rekonstituované vakcíny. Použije se nejméně deset myší, avšak takový počet, který umožní podat 3/10 dávky vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Pokud uhyne více než dvě myši během prvních 48 h, zkouška se opakuje. Od třetího do dvacátého prvního dne od podání nemají myši abnormality, které by bylo možné přisoudit vakcíně.

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Titr rekonstituované vakcíny se stanoví na vhodných buněčných kulturách nebo kuřecích embryích 9 dní až 11 dní starých. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně množství viru odpovídající minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použije se sedm vnímavých fretek prostých psinkových virusneutralizačních protilátek. Způsobem uvedeným v označení se každému z pěti zvířat podá objem rekonstituované vakcíny obsahující množství viru, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení. Další dvě zvířata se ponechají jako kontrola. Všechna zvířata se pozorují 21 dní. Po uplynutí této doby se všem zvířatům intramuskulárně vstříkne takové množství psinkového viru, které je schopné vyvolat u vnímavých fretek úhyn. Zvířata se pozorují dalších 21 dní. Zvířata vakcinovaná zůstávají zdravá a kontrolní zvířata uhynou na psinku. Jestliže jedna z kontrol přežije, zkouška se opakuje.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum morbi Marek vivum

Živá vakcína proti Markově chorobě

Je to lyofilizovaný nebo tekutý přípravek oslabeného kmene viru Markovy choroby nebo kmene herpesviru izolovaného z krůt.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*. Kmen viru se pomnožuje ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Pokud jsou buněčné kultury ptačího původu, jsou získány z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*).

Suspenze viru se sklidí a smíchá s vhodnou stabilizační tekutinou. Vakcína se může lyofilizovat.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu vakcíny se může použít pouze kmen viru prokazatelně splňující podmínky nezvratnosti oslabení, bezpečnosti a imunogenity pro zvířata, jimž je vakcína určena. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Nevratnost oslabení (pouze u vakcín založených na oslabeném kmenu viru Markovy choroby). Každému z pěti jednodenních kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) se intramuskulárně vstříkne množství viru, které odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Po sedmi dnech se od každého kuřete odeberou bílé krvinky a připraví se směsný vzorek. 1 ml směsného vzorku bílých krvinek se intraperitoneálně vstříkne každému z pěti dalších kuřat téhož věku a vnímavosti. Tento postup se opakuje šestkrát. V každé pasáži se ověří přítomnost viru. Jestliže není virus nalezen, provede se druhá série pasáží. Provede se zkouška bezpečnosti popsaná dále, ve které se použije šestá pasáž viru nebo virus nejvyšší pasáže, ze které byl získán, a nepasážovaný virus. Oba vyhovují zkoušce. Nejsou známky zvýšení virulence pasážovaného viru v porovnání s nepasážovaným virem; k tomu kromě kritérií zkoušky bezpečnosti stanovenými níže není ani významný rozdíl v mikroskopických změnách v brachiálním i ischiadickém plexu a gonádách u ptáků, kteří dostali pasážovaný virus, a u ptáků, kteří dostali virus nepasážovaný.

Bezpečnost. Použije se nejméně 120 geneticky vnímavých jednodenních kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*), která se rozdělí náhodně do tří skupin odděleně chovaných a ošetřovaných. Všechna kuřata, která uhynou v průběhu zkoušky, se pitvají na přítomnost makroskopických změn v důsledku Markovy choroby a na ostatní příčiny úhynu.

Skupina 1: Vhodným způsobem se podá takové množství viru Markovy choroby, které způsobí v průběhu 70 dnů pitvou zjistitelné makroskopické změny Markovy choroby u nejméně 70 % skutečného počtu kuřat.

Skupina 2: Zamýšleným způsobem podání se podá každému kuřeti množství vakcinačního viru, které odpovídá deseti dávkám vakcíny.

Skupina 3: Neošetřované kontroly.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže:

a) v prvních 7 dnech zkoušky neuhyne v žádné skupině více než 10 % kuřat,

b) nejméně 70 % skutečného počtu (výchozí počet snížený o počet těch, která uhynula v průběhu prvních 7 dnů zkoušky) ve skupině 1 má makroskopické změny Markovy choroby,

c) nejméně 80 % kuřat ve skupině 3 přežije 120 dnů a žádné nemá makroskopické změny Markovy choroby nebo protilátky proti viru Markovy choroby.

Vakcinační virus vyhovuje zkoušce:

a) jestliže kuřata 2. skupiny nemají makroskopické změny Markovy choroby,

b) jestliže počet přežívajících kuřat v 2. skupině ve 120 dnech stáří je nejméně 90 % přežívajících v 3. skupině.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k průkazu imunogenity kmene.

Zkoušení šarže

Pokud byly zkoušky na viry ptačí leukózy a na cizí viry na buněčných kulturách a na kuřecích embryích provedeny s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, mohou být tyto zkoušky při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěny, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s vyhovujícím výsledkem na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Totožnost vakcíny se zjišťuje imunofluorescenční zkouškou ve vnímavých buněčných kulturách za použití monoklonální protilátky.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použije se nejméně deset geneticky vnímavých jednodenních kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Způsobem uvedeným v označení se podá každému kuřeti deset dávek vakcíny, v případě potřeby rekonstituované. Kuřata se pozorují 42 dnů. Pitvají se všechna kuřata, která uhynou, a všechna přežívající, která jsou utracena po 42 dnech. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné z kuřat nemá klinické příznaky, neuhyne, ani při pitvě nevykazuje makroskopické změny přisuzovatelné vakcíně. Zkoušku nelze hodnotit a musí být opakována, pokud v průběhu pozorování více než dvě kuřata uhynou z příčin, které nejsou přisuzovatelné vakcíně.

Důkaz cizích virů na kuřecích embryích (*2.6.3*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry užívající kuřecí ambrya.

Důkaz cizích virů na buněčných kulturách (*2.6.5*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry užívající buněčné kultury.

Důkaz cizích agens na kuřatech (*2.6.6*). Vakcína vyhovuje zkoušce na cizí agens provedené na kuřatech. Provede se imunofluorescenční zkouška nebo ELISA test na virus ptačí retikuloendoteliózy se séry vakcinovaných kuřat. Výsledek je negativní.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na viry ptačí leukózy.

Bakterie a houby. Vakcína, je-li třeba rekonstituovaná, vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vakcína, je-li třeba rekonstituovaná, vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Vakcína, je-li třeba rekonstituovaná, se titruje v buněčných kulturách. Jestliže je titr vyjadřován v PFU, stanoví se počet plaků pozorováním charakteristického cytopatického efektu, přičemž se v úvahu berou pouze primární plaky. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru odpovídající minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použijí se vnímavá jednodenní kuřata z jednoho chovu, který je prost specifikovaných patogenů. Každému z nejméně třiceti kuřat pro každý uvedený způsob podání se podá takový objem vakcíny, je-li třeba rekonstituované, který obsahuje množství viru odpovídající minimálnímu titru viru uvedenému v označení. Jako kontrola slouží třicet kuřat. Po 9 dnech se čelenžuje každé kuře vhodným způsobem dostatečným množstvím virulentního viru Markovy choroby. Zvířata se pozorují nejméně 70 dnů. Úhyny se zaznamenávají a provedou se pitvy na specifické makroskopické změny Markovy choroby. Na konci období pozorování se přežívající zvířata utratí a provedou se pitvy na specifické makroskopické změny Markovy choroby. Vakcína vyhovuje zkoušce, pokud u každého stanoveného způsobu podání je celkový počet vakcinovaných zvířat vykazujících specifické makroskopické změny snížen nejméně o 80 % ve srovnání s kontrolní skupinou a jestliže čelenžní virus vyvolá specifické makroskopické změny u nejméně 70 % kontrol.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení se uvede:

- stáří zvířat, která mají být vakcinována,
- sérotyp(y) vakcinačního viru.

Vaccinum morbillorum, parotitidis et rubellae vivum

Živá vakcína proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám

Je to lyofilizovaný přípravek z vhodných oslabených kmenů virů spalniček, příušnic a zarděnek.

Vakcína se podle údajů v označení rekonstituuje bezprostředně před použitím; vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

Výroba

Tři složky vakcíny se připravují, jak je popsáno v článcích *Vaccinum morbilorum (vivum), Vaccinum parotitidis (vivum) a Vaccinum rubellae (vivum)*, a vyhovují požadavkům v nich předepsaným.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a humánních vakcín *(2.6.9)*.

Konečná várka vakcíny

Sklizně každé virové složky se spojí a vyčeří k odstranění buněk. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se vhodným způsobem naředí. Vhodná množství spojených sklizní jednotlivých složek se smíchají.

Pouze konečná várka, která vyhovuje následujícímu požadavku, se může použít pro přípravu šarže.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu; na každou půdu se použije 10 ml *(2.6.1)*.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, která je prokazatelně vhodná pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje následujícím požadavkům na teplotní stabilitu a všem požadavkům uvedeným ve Zkouškách totožnosti, Zkouškách na čistotu a ve Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byly zkoušky na bovinní sérumalbumin a případně ovalbumin provedeny s uspokojivými výsledky v konečné várce vakcíny, mohou se u šarže vynechat.

Teplotní stabilita. Zrychlená zkouška stability se provede inkubací lyofilizovaného přípravku na 37 °C po 7 dní. Pokud není jinak vysvětleno a schváleno, je po této době:

- koncentrace viru spalniček nižší nejvýše o 1 $\log_{10}$ od počáteční hodnoty a hodnota titru je nejméně $1 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v jednotlivé lidské dávce,
- koncentrace viru příušnic nižší nejvýše o 1 $\log_{10}$ od počáteční hodnoty a hodnota titru je nejméně $5 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v jednotlivé lidské dávce,
- koncentrace viru zarděnek nižší nejvýše o 1 $\log_{10}$ od počáteční hodnoty a hodnota titru je nejméně $1 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v jednotlivé lidské dávce.

Zkoušky totožnosti

Když se přípravek rekonstituuje tak, jak je uvedeno v označení, a smíchá se specifickými protilátkami pro virus spalniček, příušnic a zarděnek, není schopen infikovat buněčné kultury vnímavé k těmto virům. Když se přípravek rekonstituuje, jak je uvedeno v označení, a smíchá se s množstvím specifických protilátek postačujícím k neutralizaci dvou virových složek, třetí virová složka infikuje vnímavou buněčnou kulturu.

Zkoušky na čistotu

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu *(2.6.1)*.

Bovinní sérumalbumin. Nejvýše 50 ng v jednotlivé lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou *(2.7.1)*.

Ovalbumin. Je-li příušnicová složka připravena na kuřecích embryích, obsahuje vakcína nejvýše 1 µg ovalbuminu v jednotlivé lidské dávce. Stanoví se vhodnou imunochemickou metodou *(2.7.1)*.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3 %.

Stanovení účinnosti

A. Přípravek se smíchá s postačujícím množstvím specifických protilátek proti viru příušnic a s postačujícím množstvím specifických protilátek proti viru zarděnek. Infekční virus spalniček se titruje nejméně trojmo na pěti buněčných kulturách pro každé ředění v řadě pro 0,5 $\log_{10}$ nebo metodou o stejné přesnosti. K validaci každé zkoušky se použije vhodný referenční virový přípravek. Stanovená koncentrace viru spalniček není nižší než množství uvedené v označení; minimální koncentrace viru spalniček v označení je nejméně $1 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v jednotlivé lidské dávce. Zkouška není platná, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) logaritmu virové koncentrace je větší než ±0,3.

B. Přípravek se smíchá s postačujícím množstvím specifických protilátek proti viru spalniček a s postačujícím množstvím specifických protilátek proti viru zarděnek. Infekční virus příušnic se titruje nejméně trojmo na pěti buněčných kulturách pro každé ředění v řadě po 0,5 $\log_{10}$ nebo

metodou o stejné přesnosti. K validaci každé zkoušky se použije vhodný referenční virový přípravek. Stanovená koncentrace viru příušnic není nižší než množství uvedené v označení; minimální koncentrace viru příušnic v označení je nejméně $5 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v jednotlivé lidské dávce. Zkouška není platná, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) logaritmu virové koncentra ce je větší než ±0,3.

C. Přípravek se smíchá s postačujícím množstvím specifických protilátek proti viru spalniček a s postačujícím množstvím specifických protilátek proti viru příušnic. Infekční virus zarděnek se titruje nejméně trojmo na pěti buněčných kulturách pro každé ředění v řadě po 0,5 $\log_{10}$ nebo metodou o stejné přesnosti. K validaci každé zkoušky se použije vhodný referenční virový přípravek. Stanovená koncentrace viru zarděnek není nižší než množství uvedené v označení; minimální koncentrace viru zarděnek v označení je nejméně $1 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v jednotlivé lidské dávce. Zkouška není platná, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) logaritmu virové koncentrace je větší než ±0,3.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede:

- kmeny virů použité k přípravě vakcíny,
- zda byla při přípravě vakcíny použita kuřecí embrya,
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny,
- minimální koncentrace každé virové složky,
- varování před stykem s dezinfekčními prostředky,
- v jaké době po rekonstituci je třeba vakcínu použít,
- že se vakcína nepodává těhotným ženám a že ženy po vakcinaci nemají po dobu 2 měsíců otěhotnět.

Vaccinum morbillorum vivum

Živá vakcína proti spalničkám

Synonymum. Očkovací látka proti spalničkám

Je to lyofilizovaný přípravek ze schváleného oslabeného kmene spalničkového viru. Vakcína se rekonstituuje bezprostředně před použitím, jak je uvedeno v označení. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace viru, a je-li virus pomnožován v lidských diploidních buňkách, na systému buněčné banky. Výrobní postup prokazatelně poskytuje stále stejnou živou spalničkovou vakcínu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Pokud není určeno a schváleno jinak, neprojde virus v konečném přípravku od matečného inokula více

pasážemi než virus, který byl použit k přípravě vakcíny, která v klinické studii prokázala, že je uspokojivá z hlediska bezpečnosti a účinnosti; ani se schválenými výjimkami počet pasáží nad úroveň použitou pro klinické studie nepřesahuje počet pěti. Klinická studie je zaměřena na neškodnost a účinnost vakcíny.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Substrát pro pomnožení viru

Virus se pomnožuje v lidských diploidních buňkách (*5.2.3*) nebo v kulturách buněk z kuřecích embryí pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*).

Virové inokulum

Kmen užitého spalničkového viru je určen podle původních záznamů, které obsahují informaci o jeho původu a o následné manipulaci s ním. Aby se předešlo nadměrnému používání opic ve zkoušce na neurovirulenci, připraví se virové inokulum ve velkém množství a uchovává se lyofilizované při teplotách nižších než -20 C nebo, pokud není lyofilizované, nižších než -60 C.

Pouze virové inokulum vyhovující následujícím požadavkům se může použít pro pomnožování viru.

Zkouška totožnosti. V matečných a pracovních inokulech se prokáže spalničkový virus séroneutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Koncentrace viru v matečných a pracovních inokulech se stanoví pro zajištění pravidelnosti výroby.

Cizí agens. (*2.6.16*). Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula.

Neurovirulence (*2.6.18*). Pracovní inokulum vyhovuje zkoušce neurovirulence živých virových vakcín. Opice *Macaca* a *Cercopithecus* citlivé na spalničkový virus jsou vhodné pro tuto zkoušku.

Pomnožování a sklizeň viru

Všechny práce s buněčnou bankou a s následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek a v prostředí, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do živných médií se může přidat povolené sérum zvířecího původu (ale ne lidské), ale konečné médium pro udržení buněčného růstu při pomnožování viru neobsahuje zvířecí sérum. Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se doporučuje používat substrát bez antibiotik. Nejméně 500 ml produkčních buněčných kultur se ponechá neinfikovaných (kontrolní buňky). Sklizně virových suspenzí probíhají v době vhodné pro použitý kmen viru.

Pouze sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

Zkouška totožnosti. Sklizeň viru obsahuje virus, který se dokáže jako virus spalniček séroneutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Koncentrace viru ve sklizni se stanoví tak, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se zajistila stálost výroby a aby se stanovila ředění pro přípravu konečné várky vakcíny.

Cizí agens (*2.6.16*).

Kontrolní buňky. Kontrolní buňky kultur produkčních buněk vyhovují zkoušce totožnosti a požadavkům na cizí agens (*2.6.16*).

Konečná várka vakcíny

Pouze sklizně vyhovující výše uvedeným zkouškám se smíchají a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se vhodně zředí.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

Bakterie a houby. Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*); na každou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, která je prokazatelně vhodná pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje následujícím požadavkům na teplotní stabilitu a všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška na bovinní sérumalbumin provedena s uspokojivým výsledkem na konečné várce vakcíny, může se u šarže vypustit.

Teplotní stabilita. Zrychlená zkouška stability se provede inkubací lyofilizovaného přípravku na 37 °C po 7 dní. Koncentrace viru po této době klesne nejvýše o 1 $\log_{10}$ než je počáteční hodnota, a v žádném případě není nižší než $1 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ na dávku.

Zkouška totožnosti

Když se vakcína, rekonstituovaná podle údajů v označení, smíchá se specifickými spalničkovými protilátkami, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

Zkoušky na čistotu

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Bovinní sérumalbumin. Nejvýše 50 ng v jednotlivé lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení účinnosti

Infekční virus vakcíny se titruje nejméně trojmo na pěti buněčných kulturách pro každé ředění v řadě po 0,5 $\log_{10}$ nebo metodou o stejné přesnosti.

K validaci každé zkoušky se použije vhodný referenční virový přípravek. Stanovená koncentrace viru není nižší než koncentrace uvedená v označení; minimální koncentrace viru v označení je nejméně $1 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v lidské dávce. Zkouška není platná, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) logaritmu virové koncentrace je větší než ±0,3.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede:
- kmen viru použitý pro přípravu vakcíny,
- typ a původ buněk použitých pro přípravu vakcíny,
- minimální koncentrace viru,
- varování před stykem s dezinfekčními prostředky,
- doba, do které je třeba vakcínu po rekonstituci použít.

Vaccinum panleucopeniae felinae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti panleukopenii koček

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek z viru panleukopenie koček nebo viru psí parvovirózy inaktivovaného vhodnou metodou.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Virus se pomnožuje ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Virus se může purifikovat a koncentrovat.

Zkouška na rezidua infekčního viru panleukopenie koček se provádí na nerozplněné sklizni každé šarže k potvrzení inaktivace. Množství inaktivovaného viru použitého ve zkoušce odpovídá nejméně 100 dávkám vakcíny. Vakcína se naočkuje na vhodnou, ne zcela narostlou buněčnou kulturu; po inkubaci 8 dní se po trypsinizaci připraví subkultura. Po inkubaci dalších 8 dní se kultury vyšetří na rezidua živých parvovirů imunofluorescenční zkouškou. Imunofluorescenční zkouška se může doplnit hemaglutinační zkouškou nebo jinými vhodnými zkouškami v supernatantu buněčných kultur. Nezjistí se žádný živý virus.

Vakcína může obsahovat jedno nebo více adjuvancií.

Výběr složení vakcíny

Vakcína je prokazatelně uspokojivá z hlediska imunogenity u koček. Imunogenita se může prokázat následující zkouškou.

Imunogenita. Použije se deset vnímavých koček 8 až 12 týdnů starých. Každé kočce se odebere vzorek krve a individuálně se vyšetří na nepřítomnost protilátek proti viru panleukopenie koček, aby se zjistila vnímavost. Pět koček se očkuje podle doporučeného plánu. Počty leukocytů se stanoví 8 dní a 4 dny před čelenží, aby se určila výchozí hodnota. 20 až 22 dní od poslední vakcinace se každé kočce intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml suspenze patogenního viru panleukopenie koček. Kočky se pozorují 14 dní. Počty leukoctů se stanoví čtvrtý, šestý, osmý a desátý den po čelenži. U všech pěti kontrolních koček se počet leukocytů sníží nejméně o 75 % oproti výchozí hodnotě; tato zvířata mohou uhynout za příznaků panleukopenie. U vakcinovaných koček nedojde k onemocnění panleukopenií, to znamená, že snížení počtu leukocytů nepřesáhne v žádném ze čtyř odběrů 50 % výchozí hodnoty. Tyto kočky zůstanou zcela zdravé.

Zkouška totožnosti

Po podání kočkám podporuje vakcína tvorbu protilátek proti parvoviru, který je ve vakcíně přítomen.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Způsobem uvedeným v označení se každé ze dvou zdravých vnímavých koček 8 až 12 týdnů starých podá dvojnásobná dávka vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Nezjistí se žádná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Stanovení účinnosti

Provede se zkouška A nebo B.

A. Použijí se čtyři vnímavé kočky 8 až 12 týdnů staré. Každé kočce se odebere vzorek krve a vyšetří se individuálně na protilátky proti viru panleukopenie koček, aby se stanovila vnímavost. Každé ze dvou koček se podá způsobem uvedeným v označení jedna dávka vakcíny. Za 21 dní se odebere každé kočce krev a připraví se odděleně vzorek séra. Séra se 30 min inaktivují zahřátím na 56 C. K jednomu objemovému dílu z každého séra se přidá devět objemových dílů suspenze *kaolinu lehkého R* (200 g/l) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným o pH 7,4*. Každá směs se míchá 20 min. Po odstředění se odebere supernatantní tekutina a smíchá se s jedním objemem koncentrované suspenze prasečích erytrocytů. Nechá se 60 min inkubovat při 4 C a poté se odstředí. Ředění takto připraveného séra je 1 : 10. Od každého séra se připraví řada dvojnásobných ředění. Ke každému z těchto ředění o objemu 0,025 ml se přidá 0,025 ml suspenze antigenu psí parvovirózy obsahující čtyři hemaglutinační jednotky. Nechá se 30 min inkubovat při 37 C a poté se přidá 0,05 ml suspenze prasečích erytrocytů o koncentraci $30 . 10^6$ buněk v mililitru. Inkubuje se 90 min při 4 C a pak se zaznamená poslední ředění séra, kde ještě došlo k úplné inhibici hemaglutinace. Vakcína vyhovuje, jestliže v sérech obou vakcinovaných koček byl zaznamenán titr nejméně 1 : 20. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže obě kontrolní kočky zůstanou séronegativní.

B. Dvě zdravé vnímavé kočky stáří 8 až 12 týdnů, u kterých byl naměřen titr protilátek v 0,1 ml séra při stanovení níže popsanou metodou nižší než 4 ND_{50} (padesátiprocentní neutralizační dávka), se vakcinují způsobem uvedeným v označení. Za 14 dní po vakcinaci se vyšetří sérum každého zvířete následujícím postupem. Séra se 30 min zahřívají na 56 C a pak se připraví sériová ředění v médiu vhodném pro kočičí buňky. Ke každému ředění se přidá stejný objem virové suspenze obsahující takové množství viru, které, je-li ve vhodné směsi séra a viru inokulováno na buněčnou kulturu, obsahuje přibližně $10^4 CCID_{50}$. Směsi se inkubují při 37 C 1 h a každá se inokuluje v odpovídajícím objemu na čtyři buněčné kultury. Buněčné kultury se inkubují při 37 C 7 dní a po následné druhé pasáži dalších 7 dní. Kultury se vyšetřují na přítomnost specifických cytopatických efektů a vypočítá se titr protilátek. Vakcína vyhovuje, jestliže průměrný titr je nejméně 32 ND_{50} v 0,1 ml séra. Jestliže u jedné kočky nedojde k protilátkové odpovědi, zkouška se opakuje na dalších dvou kočkách a výsledek se vypočítá jako průměrná hodnota všech titrů naměřených u všech tří koček, u kterých došlo k protilátkové odpovědi.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Vaccinum panleucopeniae felinae infectivae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti panleukopenii koček lyofilizovaná

Je to přípravek z oslabeného viru panleukopenie koček.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Virus se pomnožuje ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Virová suspenze se sklidí, titruje, ředí vhodným stabilizujícím roztokem a lyofilizuje.

Výběr vakcinačního kmene

Pouze virový kmen prokazatelně uspokojivý z hlediska bezpečnosti a imunogenity se může použít k přípravě vakcíny. K důkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a imunogenity (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Bezpečnost. Pěti zdravým vnímavým kočkám dva až čtyři měsíce starým a prostým specifických neutralizujících protilátek se podá subkutánně po 0,5 ml virové suspenze. Toto množství odpovídá třem dávkám vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Odběr krve se provádí 4., 6., 8. a 10. den po podání. Inokulum vyhovuje zkoušce, pokud nejsou zjištěny žádné klinické nebo hematologické změny. U žádného zvířete ani u žádného krevního obrazu neklesne počet leukocytů o více než 50 % počtů zjištěných u dvou odběrů provedených 8. a 4. den před inokulací.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k průkazu imunogenity virového kmene.

Zkoušení šarže

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s uspokojivými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška vypuštěna z rutinní kontroly jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula, dá-li k tomu souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Vakcína rekonstituovaná podle údajů v označení způsobí ve vnímavé buněčné kultuře cytopatický efekt. Přítomnost viru se může stanovit imunofluorescencí. Neutralizovaná vakcína již nevyvolá cytopatický efekt.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma zdravým vnímavým kočkám ve věku uvedeném v označení se podá doporučeným způsobem dvojitá dávka rekonstituované vakcíny. Zvířata se pozorují 14 dní. Nezjistí se významné místní ani systémové změny.

Cizí viry. Osmi myším hmotnosti 14 g až 16 g se intracerebrálně vstříkne 0,03 ml rekonstituované vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Nevznikne žádný patogenní efekt. Úhyn zvířete do 24 h po inokulaci se považuje za nespecifický a zvíře se vyřadí. Jestliže jedno zvíře uhyne za 24 h nebo později po inokulaci, zkouška se opakuje. Pokud uhyne jedno zvíře i v druhé zkoušce, vakcína nevyhovuje.

Vakcína se neutralizuje monospecifickým antisérem. Vakcína pak již nevyvolává cytopatický efekt ve vnímavé buněčné kultuře.

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Titr viru. Nejméně 10^3 $CCID_{50}$ v dávce. Vakcína se titruje na kultuře kočičích buněk.

Stanovení účinosti

Pěti zdravým vnímavým kočkám ve stáří 2 až 4 měsíce se vstříkne subkutánně po jedné dávce vakcíny. Za 20 až 22 dní se provede čelenž současně s dalšími pěti zdravými a vnímavými kontrolními kočkami stejného stáří. Každému zvířeti se intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml suspenze patogenního viru panleukopenie koček. Kočky se pozorují 14 dní. Provede se kontrola počtu leukocytů 4., 6., 8. a 10. den po čelenži. U všech pěti kontrolních koček se projeví snížení počtu leukocytů převyšující 75 % počáteční hodnoty, která byla stanovena 8. a 4. den před inokulací virové suspenze. Tato zvířata mohou uhynout na leukopenii. U pěti vakcinovaných koček se neobjeví příznaky leukopenie a snížení počtu leukocytů nepřevyšuje u žádného ze čtyř počítání 50 % z průměru počáteční hodnoty. Tyto kočky zůstávají zcela zdravé.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení se uvede:

- stáří doporučené pro vakcinaci,
- že se vakcína nepoužívá u březích koček (ledaže by byla prokázána její bezpečnost v takových podmínkách).

Vaccinum parotitidis vivum

Živá vakcína proti příušnicím

Je to lyofilizovaný přípravek z vhodného oslabeného kmene viru příušnic (*Paramyxovirus parotitidis).* Vakcína se rekonstituuje bezprostředně před použitím, jak je uvedeno v označení. Vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace, a je-li virus pomnožován v lidských diploidních buňkách, na systému buněčné banky. Výrobní postup prokazatelně poskytuje stále stejnou živou vakcínu přiměřené imunogenity a neškodnosti pro člověka. Jestliže není určeno a schváleno jinak, virus v konečné vakcíně neprošel od matečného inokula více pasážemi, než u přípravku, který v klinické studii vyhověl v účinnosti a neškodnosti.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Substrát pro pomnožení viru

Virus se pomnožuje v lidských diploidních buňkách (*5.2.3*) nebo v buňkách kuřecího embrya nebo v amniotické dutině kuřecích embryí pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*).

Virové inokulum

Kmen viru příušnic je určen podle průvodních záznamů, které obsahují informaci o jeho původu a následné manipulaci s ním. Aby se předešlo nadměrnému používání opic ve zkoušce na neurovirulenci, připraví se virové inokulum ve velkém množství a uchovává se lyofilizované při teplotách nižších než -20 °C nebo, pokud není lyofilizováno, nižších než - 60 °C.

Pouze virové inokulum vyhovující následujícím předpisům se může použít pro pomnožování viru.

Zkouška totožnosti. V matečných i pracovních inokulech se prokáže virus příušnic séroneutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Koncentrace viru v matečných i v pracovních inokulech se stanoví pro zajištění pravidelnosti výroby.

Cizí agens (*2.6.16*). Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům pro virové inokulum.

Neurovirulence (*2.6.18*). Pracovní inokulum vyhovuje zkoušce na neurovirulenci pro živé virové vakcíny. Pro tyto zkoušky jsou vhodné opice *Macaca* a *Cercopithecus*.

Pomnožování a sklizeň viru

Všechny práce s buněčnou bankou a s následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek a v prostředí, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do živných médií se může přidat povolené sérum zvířecího původu (ale ne lidské). Sérum a trypsin používané při přípravě buněčných suspenzí a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se doporučuje používat substrát bez antibiotik. Nejméně 500 ml produkčních buněčných kultur se ponechává neinfikovaných (kontrolní buňky). Pokud je virus pomnožován v kuřecích embryích, ponechávají se 2 % (nejméně dvacet vajec) neinfikovaných. Sklizně virových suspenzí probíhají v době vhodné pro použitý kmen viru.

Pouze sklizeň vyhovující následujícím požadavkům se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

Zkouška totožnosti. Sklizeň viru obsahuje virus, který se dokáže jako virus příušnic séroneutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Koncentrace viru ve sklizni se stanoví tak, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se zajistila stálost výroby a aby se stanovila ředění pro přípravu konečné várky.

Cizí agens (*2.6.16*).

Kontrolní buňky nebo vejce. Kontrolní buňky kultur produkčních buněk vyhovují zkoušce totožnosti; kontrolní buňky a kontrolní vejce vyhovují požadavkům na cizí agens (*2.6.16*).

Konečná várka vakcíny

Pouze sklizně vyhovující výše uvedeným zkouškám se smíchají a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se vhodně zředí.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

Bakterie a houby. Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*); na každou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, která je prokazatelně vhodná pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje následujícím požadavkům na teplotní stabilitu a všem z požadavků uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška na bovinní sérumalbumin a případně též ovalbumin provedena s uspokojivým výsledkem na konečné várce vakcíny, mohou být u šarže vypuštěny.

Teplotní stabilita. Zrychlená zkouška stability se provede inkubací lyofilizovaného přípravku na 37 °C po 7 dní. Koncentrace viru po této době klesne nejvýše o 1 $\log_{10}$ než je počáteční hodnota, a v žádném případě není nižší než $5 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ na dávku.

Zkouška totožnosti

Když se vakcína, rekonstituovaná podle údajů v označení, smíchá se specifickými parotitickými protilátkami, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

Zkoušky na čistotu

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Bovinní sérumalbumin. Nejvýše 50 ng v jednotlivé lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Ovalbumin. Je-li vakcína připravena na kuřecích embryích, obsahuje nejvýše 1 μg ovalbuminu v jednotlivé lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení účinnosti

Infekční virus vakcíny se titruje nejméně trojmo na pěti buněčných kulturách pro každé ředění v řadě po 0,5 $\log_{10}$ nebo metodou o stejné přesnosti.

K validaci každé zkoušky se použije vhodný referenční virový přípravek. Stanovená koncentrace viru není nižší než množství uvedené v označení; minimální koncentrace viru v označení je nejméně $5 \cdot 10^3$ $CCID_{50}$ v lidské dávce. Zkouška není platná, jestliže interval spolehlivosti (P = 0,95) logaritmu virové koncentrace je větší než ±0,3.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny,
- zda byla vakcína připravena na kuřecích embryích nebo typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny,
- minimální koncentrace viru,
- varování před stykem s dezinfekčními prostředky,
- doba, do které je třeba vakcínu po rekonstituci použít.

Vaccinum parvovirosis caninae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti parvoviróze psů

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek viru parvovirózy psů inaktivovaného vhodnou metodou.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Virus se pomnoží ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Virus se může purifikovat a koncentrovat.

Zkouška na rezidua živého viru se provede z nerozplněné sklizně každé šarže, aby se potvrdila inaktivace parvoviru. Množství inaktivovaného viru použitého ke zkoušce odpovídá nejméně 100 dávkám vakcíny. Vakcína se inokuluje na vhodné nesplývající buňky; po osmidenní inkubaci se po trypsinizaci založí subkultura. Po další osmidenní kultivaci se kultura zkouší na přítomnost zbylého živého viru imunofluorescencí. Imunofluorescence se může doplnit hemaglutinací nebo jinou vhodnou zkouškou supernatantu z buněčné kultury. Nezjistí se živý virus.

Vakcína může obsahovat jedno nebo více adjuvancií.

Výběr složení vakcíny

Vakcína je prokazatelně uspokojivá z hlediska imunogenity pro psy. K průkazu účinnosti (*5.2.7*) se použijí následující zkoušky.

Imunogenita. Použije se sedm vnímavých psů v minimálním věku doporučeném pro vakcinaci. Od každého psa se odeberou vzorky krve a individuálně se vyšetří na protilátky proti parvoviróze psů k určení vnímavosti. Pět psů se vakcinuje podle doporučeného plánu, dva psi se ponechají jako kontrola. Za 20 až 22 dní po poslední vakcinaci se každému psu oronazálně podá suspenze patogenního psího parvoviru. Psi se pozorují 14 dní a provedou se hemaglutinační zkoušky k průkazu viru ve výkalech. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže dva kontrolní psi mají typické příznaky onemocnění nebo leukopenii a vylučují virus. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže pět vakcinovaných psů zůstává v dobrém zdravotním stavu a nevykazuje známky onemocnění ani leukopenii a jestliže maximální titr viru vylučovaného výkaly je menší než setina geometrického průměru maximálních titrů nalezených u kontrolních zvířat.

Zkouška totožnosti

Po podání psům podporuje vakcína tvorbu protilátek proti parvoviróze psů.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Způsobem uvedeným v označení se každému ze dvou zdravých vnímavých psů v minimálním věku pro vakcinaci podle údajů v označení vstříkne dvojnásobná vakcinační dávka. Zvířata se pozorují 14 dní. Nezjistí se významná místní ani systémová reakce.

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Provede se buď zkouška A, nebo B.

A. Pěti morčatům, která nemají specifické protilátky, se každému subkutánně vstříkne polovina dávky uvedené v označení. Po 14 dnech se opět podání poloviční dávky opakuje. Za dalších 14 dní se odeberou vzorky krve a oddělí sérum. Každé sérum se 30 min inaktivuje zahřátím na 56 °C. K jednomu objemovému dílu každého séra se přidá devět objemových dílů suspenze *kaolinu lehkého R* (200 g/l) v *tlumivém roztoku fosforečnanovém s chloridem sodným o pH 7,4*. Každá směs se míchá 20 min. Po odstředění se oddělí supernatantní tekutina a smíchá se s jedním objemovým dílem koncentrované suspenze prasečích erytrocytů. Ponechá se stát 60 min při 4 °C a odstředí se. Připravená séra jsou tímto postupem naředěna 1 : 10, dále se ředí dvojnásobnou řadou. K 0,025 ml každého posledního ředění se přidá 0,025 ml suspenze psího parvovirového antigenu obsahující 4 hemaglutinační jednotky. Nechá se stát 30 min při 37 °C, potom se přidá 0,05 ml suspenze prasečích erytrocytů obsahující $30 \cdot 10^6$ buněk/ml. Nechá se stát 90 min při 4 °C a poznamená se poslední ředění séra, které ještě úplně inhibuje hemaglutinaci. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže střední titr protilátek v sérech odebraných po druhé vakcinaci je nejméně 1 : 80.

B. Vakcinace se provede podle plánu v označení dvěma zdravým vnímavým psům starým 8 až 12 týdnů, kteří mají titr protilátek nižší než 4 ND_{50} (50% neutralizační dávky) v 0,1 ml séra stanovený dále popsanou metodou. Za 14 dní po vakcinaci se sérum každého zvířete zkouší následovně. Sérum se 30 min zahřívá na 56 °C a připraví se sériové ředění v médiu vhodném pro psí buňky. Ke každému ředění se přidá stejný objem virové suspenze obsahující takové množství viru, že když se objem směsi séra a viru vhodný pro zkušební systém inokuluje do buněčných kultur, je v každé kultuře asi 10^4 $CCID_{50}$ Směsi se 1 h inkubují při 37 °C a poté se inokuluje na čtyři kultury psích buněk vhodným objemem každé směsi. Buněčné kultury se 7 dní inkubují při 37 °C. Potom se provede pasáž a subkultury se inkubují dalších 7 dní. Kultury se vyšetřují na přítomnost specifického cytopatického efektu a stanoví se titr protilátek. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný titr je nejméně 32 ND_{50} v 0,1 ml séra. Jestliže jeden pes nevykazuje vzestup protilátek, opakuje se zkouška na dalších dvou psech a výsledek se stanoví z průměrného titru protilátek naměřeného u tří psů, kteří vykázali protilátkovou odpověď.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Vaccinum parvovirosis caninae vivum

Živá vakcína proti parvoviróze psů

Je to přípravek z kmene psího parvoviru, který je oslaben pro psy.

Výroba

Viz článek *Vaccinum ad usum veterinarium*.

Oslabený virus se pomnoží ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*).

Virová suspenze se sklidí, titruje a smíchá s vhodným stabilizujícím roztokem. Vakcína se může lyofilizovat.

Pouze virový kmen, který je prokazatelně postačující s ohledem na bezpečnost, nevratnost oslabení a imunogenitu, se může použít pro výrobu vakcíny. Bezpečnost (*5.2.6*) a účinnost (*5.2.7*) se prokážou následujícími zkouškami.

Bezpečnost. Pro každý doporučený způsob podání se provede zkouška.

Pro zkoušku se použije pět vnímavých štěňat bez hemaglutinačně inhibičních protilátek proti psímu parvoviru v minimálním věku pro vakcinaci doporučeném v označení. Počet bílých krvinek v obíhající krvi se stanoví 4 a 2 dny před podáním a v den podání vakcinačního kmene. Každému štěněti se podá jedním ze způsobů doporučených v označení množství viru odpovídající nejméně desetinásobku maximálního titru viru, který se může očekávat u šarže vakcíny při nejnižším stupni pasáže viru. Štěnata se pozorují 21 dní. Stanovení počtu bílých krvinek v obíhající krvi se provádí 3., 5., 7. a 10. den po injekci. Štěňata zůstanou zdravá a neobjeví se abnormální lokální ani systémová reakce. Pokles obíhajících bílých krvinek nepřesahuje 50 % původního počtu, který je průměrem tří hodnot zjištěných před vstříknutím vakcinačního kmene.

Množství viru odpovídající nejméně desetinásobku nejvyššího titru, který lze očekávat u šarže vakcíny a při nejnižším stupni pasáže viru, se podá jedním z doporučených způsobů každému z pěti vnímavých štěňat. Pět štěňat se drží jako kontrola. Dvě štěňata z každé skupiny se usmrtí za 14 dní a zbývající tři z každé skupiny za 21 dní. Provede se histologické vyšetření thymu všech zvířat. Mírná hypoplazie thymu může být zřejmá po 14 dnech. Kmen není přijatelný, je-li poškození zřejmé po 21 dnech.

Nevratnost oslabení. Množství viru odpovídající desetinásobku maximálního titru, který se může očekávat u šarže vakcíny, se podá jedním ze způsobů doporučených v označení každému ze dvou vnímavých štěňat, která nemají hemaglutinačně inhibiční protilátky proti psímu parvoviru a jsou v nejnižším doporučeném věku pro vakcinaci. Od druhého do desátého dne po podání viru se odebírají výkaly od každého štěněte a prověří na přítomnost viru. Výkaly obsahující virus se smíchají. 1 ml suspenze smíchaných výkalů se podá oronazální cestou každému ze dvou dalších štěňat stejného věku a vnímavosti. Tento postup se provede čtyřikrát. Přítomnost viru se ověří v každé pasáži. Jestliže se virus nezjistí, provede se druhá řada pasáží. Jestliže se virus nezjistí v jedné pasáži z druhé řady, vakcinační kmen vyhovuje zkoušce. Žádné štěně neuhyne nebo nemá příznaky, které by se daly přičíst vakcíně. Nezjistí se známky vzestupu virulence ve srovnání s původním vakcinačním virem. V úvahu se bere zejména počet bílých krvinek, výsledky histologických vyšetření thymu a titr vylučovaného viru.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná k prokázání imunogenity kmene.

Zkoušení šarže

Pokud se provede stanovení účinnosti s vyhovujícím výsledkem na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní zkoušce jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěna, dá-li k tomu souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Vakcína se pomnoží ve vnímavých buněčných liniích v prostředí vhodném pro průkaz pomocí fluorescenčních protilátek nebo pro imunoperoxidasové zkoušky včetně vhodných kontrol. Část buněk se zkouší monoklonálními protilátkami specifickými pro psí parvovirus a část buněk se zkouší monoklonálními protilátkami specifickými pro kočičí parvovirus. V buňkách naočkovaných vakcínou je detekován antigen psího parvoviru, ale není zjištěn kočičí parvovirus.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě štěňata v nejnižším věku pro vakcinaci uvedeném v označení, přednostně taková, která nemají hemaglutinačně-inhibiční protilátky proti psímu parvoviru. Každému se podá deset dávek vakcíny jedním ze způsobů podle označení a pozorují se 14 dní. Psi zůstávají v dobrém zdravotním stavu bez abnormálních lokálních nebo systémových reakcí.

Cizí viry. Vakcína se smíchá s vhodným antisérem proti psímu parvoviru a inokuluje se do buněčných kultur, o nichž je známo, že jsou vnímavé na psí patogenní viry. Nerozvine se žádný cytopatický efekt. Nejsou žádné známky hemaglutinačních a hemadsorpčních agens ani jiné znaky přítomnosti cizích virů.

Bakterie a houby. Vakcína, je-li třeba rekonstituovaná, vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Mykoplazmata. Vakcína, je-li třeba rekonstituovaná, vyhovuje zkoušce na mykoplazmata (neaviární mykoplazmata a ureoplazmata).

Titr viru. Je-li třeba, vakcína se rekonstituuje podle označení a titruje se ve vhodných buněčných kulturách. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použije se sedm vnímavých štěňat, která nemají hemaglutinačně-inhibiční protilátky proti psímu parvoviru a jsou v nejnižším věku pro vakcinaci uvedeném v označení. Dvě štěňata se nechají jako kontrola a ostatním se podá jedním ze způsobů uvedených v označení takové množství viru, které odpovídá nejnižšímu titru uvedenému v označení. Všechna štěňata se pozorují 20 až 22 dní a potom se každému podá oronazální cestou suspenze virulentního psího parvoviru. Všechna zvířata se pozorují 14 dní a provede se hemaglutinační zkouška na virus ve výkalech. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže dvě kontrolní štěňata mají typické příznaky nemoci a případně také leukopenii a vylučují virus. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže pět vakcinovaných štěňat zůstává v dobrém zdravotním stavu a nemá příznaky nemoci ani leukopenii a jestliže maximální titr viru vylučovaného výkaly je menší než setina geometrického průměru nejvyšších titrů nalezených u kontrolních zvířat.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Vaccinum parvovirosis inactivatum ad suem

Inaktivovaná vakcína proti parvoviróze prasat

Je to suspenze inaktivovaného parvoviru prasat nebo neinfekčních částic tohoto viru.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Virus se pomnožuje ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Suspenze viru se sklidí, virus se inaktivuje metodou, která zabrání ztrátě jeho imunogenity, může se rozbít (může se inaktivovat dezintegrací). Virus nebo virové částice se mohou purifikovat a koncentrovat ve vhodném stupni výrobního postupu.

U každé šarže antigenu se provede zkouška na rezidua infekčního parvoviru prasat ihned po inaktivaci z celkového konečného množství nebo, jestliže vakcína obsahuje adjuvans, provede se kontrola z celkového množství antigenu nebo ze směsi bezprostředně před přidáním adjuvans. Ke zkoušce se použije množství odpovídající nejméně 100 dávkám vakcíny. Nerozplněná sklizeň se inokuluje na vhodné nesplývající buňky, po sedmidenní inkubaci se připraví subkultura po trypsinizaci buněk, po inkubaci dalších 7 dnů se kultury vyšetří imunofluorescenční zkouškou na rezidua živého parvoviru. Nezjistí se živý virus.

Vakcína může obsahovat jedno nebo více vhodných adjuvans.

Výběr složení vakcíny

Vakcína je prokazatelně uspokojivá z hlediska bezpečnosti (včetně toho, že nemá nežádoucí účinky na plodnost, březost, porodnost, potomstvo) a je imunogenní pro prasata. Bezpečnost (*5.2.6*) a účinnost (*5.2.7*) se mohou prokázat následujícími zkouškami.

Bezpečnost.

A. Zkouška se provádí s každou kategorií zvířat, pro které je vakcína určena, a všemi doporučenými způsoby. Použitá zvířata nemají protilátky proti prasečímu parvoviru nebo frakcím viru. Dvě dávky vakcíny se podají zamýšleným způsobem každému z nejméně deseti zvířat. Po 14 dnech se každému zvířeti podá ještě jedna dávka vakcíny. Zvířata se pozorují dalších 14 dnů. Během 28 dnů trvání této zkoušky se nezjistí žádné abnormální místní nebo systémové reakce. Jestliže je vakcína určena pro březí prasnice, prodlouží se zkouška v této kategorii zvířat do doby porodu a nezjistí se žádný vliv na březost či potomstvo.

B. Zvířata používaná ke zkoušce imunogenity jsou také používána k hodnocení bezpečnosti. Každému vakcinovanému zvířeti se měří rektální teplota při vakcinaci a za 24 h a 48 h po vakcinaci. Nedojde k abnormálnímu účinku na teplotu těla nebo jiným celkovým reakcím (např. anorexie). Místo vpichu se vyšetří na lokální reakce po vakcinaci a na jatkách. Nezjistí se nadměrné lokální reakce.

C. Rovněž zvířata používaná k terénním pokusům jsou využita k hodnocení bezpečnosti. Zkouška se provádí na každé kategorii zvířat, pro kterou je vakcína určena (prasnice, prasničky). Použijí se nejméně tři skupiny zvířat, v každé skupině nejméně dvacet kusů, v kontrolní skupině

nejméně deset kusů. Rektální teplota se měří při vakcinaci a za 24 h a 48 h po vakcinaci. Nedojde k abnormálnímu účinku na teplotu těla. Místo vpichu se vyšetří na lokální reakce po vakcinaci a na jatkách. Nezjistí se nadměrné lokální reakce.

Imunogenita. Zkouška popsaná jako Stanovení účinnosti se může použít k důkazu imunogenity vakcíny.

Dále popsaná zkouška se neprovádí při rutinním zkoušení šarží vakcíny. Provede se s danou vakcínou při jedné nebo více příležitostech podle rozhodnutí nebo souhlasu oprávněné autority; kde se tato zkouška neprovede, nahradí se vhodnou validovanou zkouškou. Kritéria pro přijetí se stanoví ze vztahu k šarži vakcíny, která dávala vyhovující výsledky ve zkoušce popsané v odstavci Stanovení účinnosti. Následující zkouška se může použít po uspokojivé korelaci se zkouškou popsanou v odstavci Stanovení účinnosti, které bylo dosaženo statistickým vyhodnocením.

Subkutánně se vakcinuje nejméně pět morčat ve stáří 5 až 7 týdnů podle vakcinačního schématu uvedeného v označení; použije se jedna čtvrtina objemu předepsané dávky. Odeberou se vzorky krve v době po maximální tvorbě protilátek a provedou se zkoušky se sérem na specifické protilátky hemaglutinačně-inhibičním testem nebo jinou vhodnou zkouškou. Titry protilátek nejsou nižší než titry získané s šarží vakcíny, která vyhověla ve zkoušce na prasatech (viz Stanovení účinnosti).

Zkouška totožnosti

Vakcína podaná jednou nebo, je-li třeba, vícekrát vnímavým zvířatům povzbuzuje tvorbu specifických protilátek proti parvoviru prasat nebo frakcím tohoto viru používaným k přípravě vakcíny.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se dvě prasata ve stáří 6 týdnů až 6 měsíců, která nemají protilátky proti parvoviru prasat nebo frakcím tohoto viru. Každé zvíře se očkuje dvojnásobnou dávkou vakcíny způsobem uvedeným v označení. Zvířata se pozorují 14 dnů a každému praseti se vstříkne ještě jednoduchá dávka. Zvířata se pozorují dalších 14 dnů. Nezjistí se žádné nadměrné místní ani systémové reakce během 28 dnů zkoušky.

Inaktivace. *Zkoušku může výrobce vypustit, jestliže byla provedena s nerozplněnou vakcínou, bezprostředně před přidáním adjuvancia, je-li to vhodné.*

Použije se množství vakcíny odpovídající deseti dávkám. Jestliže vakcína obsahuje olejové adjuvans, rozloží se emulze a oddělí se fáze. Jestliže vakcína obsahuje minerální adjuvans, provede se eluce k uvolnění viru. Virová suspenze se stokrát koncentruje ultrafiltrací nebo ultracentrifugací. Žádný z výše uvedených postupů nesmí inaktivovat nebo jinak vadit detekci živého viru. Provede se zkouška na rezidua živého viru na vhodných nesplývajících buňkách, po sedmidenní inkubaci se po trypsinizaci připraví subkultura a po další sedmidenní inkubaci se kultury vyšetří na rezidua živého parvoviru imunofluorescencí. Nezjistí se živý virus.

Cizí viry. U prasat použitých na zkoušku bezpečnosti se vyšetří protilátky. Vakcína vytváří protilátky pouze proti parvoviru prasat, nepodporuje tvorbu protilátek proti jiným patogenním virům pro prasata nebo proti virům, jež mohou bránit diagnostice jiných infekcí prasat (včetně viru moru prasat).

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Nejméně sedm prasniček ve stáří 5 až 6 měsíců, které nemají protilátky proti parvoviru prasat nebo proti frakcím tohoto viru, se vakcinuje podle doporučeného plánu. Interval mezi vakcinací a připouštěním je uveden v návodu. Připouštějí se prasničky dva po sobě následující dny s příznaky říje. Nejméně pět nevakcinovaných připuštěných prasniček stejného věku se použije jako kontroly. Kolem 40. dne březosti se všechny prasničky čelenžují vhodným kmenem parvoviru prasat. Prasničky se v 90 dnech březosti porazí a jejich plody se vyšetří na infekci parvovirem prasat. Prokazuje se buď nepřítomnost viru, nebo protilátek. Vakcína vyhovuje, jestliže nejméně 80 % z celkového počtu selat od vakcinovaných prasniček je chráněno proti infekci. Zkoušku lze hodnotit jen v případě, že nejméně sedm vakcinovaných a pět kontrolních prasniček bylo čelenžováno; nejméně 90 % selat kontrolní skupiny je infikováno, průměrný počet selat na jeden vrh od vakcinovaných prasniček je nejméně šest.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Vaccinum pertussis

Vakcína proti dávivému kašli

Synonymum. Očkovací látka proti dávivému kašli

Je to sterilní suspenze inaktivovaných celých buněk jednoho nebo více kmenů mikroba *Bordetella pertussis* ve fyziologickém roztoku.

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Použije se jeden nebo více kmenů mikroba *B. pertussis* známého původu a udržování. Kmeny, živná půda a kultivační metoda se volí tak, aby v hotovém přípravku byly zastoupeny aglutinogeny 1, 2 a 3. Každý kmen se pěstuje 24 h až 72 h v tekuté půdě nebo na pevné půdě; půda použitá při posledním kultivačním stupni neobsahuje krev nebo krevní deriváty. Lidská krev ani krevní deriváty z ní připravené se v živných půdách nepoužijí. Bakterie se sklidí z půdy, promytím se odstraní příměsi pocházející z živné půdy a bakterie se suspendují v roztoku chloridu sodného (9 g/l) nebo v jiném vhodném izotonickém roztoku. Denzita suspenze se stanoví nejpozději dva týdny po stažení z půdy porovnáním s mezinárodním referenčním přípravkem denzity a takto získaná hodnota se použije jako základ pro výpočet v následujících krocích při přípravě vakcíny. Hodnotu mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Jednotlivé sklizně se nepoužijí pro konečnou várku vakcíny, pokud nebylo prokázáno, že obsahují buňky *B. pertussis* se stejnými vlastnostmi, pokud jde o růst a aglutinogeny, jako původní kmen a že nejsou kontaminovány bakteriemi a houbami. Bakterie se usmrtí a detoxikují za kontrolovaných podmínek buď vhodnou chemickou látkou, nebo teplem, nebo kombinací těchto dvou me-

tod. Nepřítomnost živých mikrobů *B. pertussis* se zkouší za použití vhodné živné půdy. Suspenze se uchovává po vhodnou dobu při (5 ± 3) °C, aby se snížila její toxicita.

Konečná várka vakcíny

Vhodná množství již inaktivovaných jednotlivých sklizní se smíchají a připraví se konečná várka vakcíny. Je možno přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Koncentrace bakterií v konečné várce by neměla odpovídat denzitě větší než 20 m.j. na jednu lidskou dávku. Pokud se použijí dva nebo více kmenů *B. pertussis*, je složení po sobě jdoucích šarží vycházejících z konečné várky vakcíny stejné, pokud jde o zastoupení každého kmene vyjádřené v jednotkách denzity.

K přípravě šarže přípravku se použije pouze ta konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu za použití 10 ml zkoušené látky pro každou živnou půdu.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkouška totožnosti

Totožnost zkoušeného přípravku se prokazuje aglutinací obsažených bakterií specifickými antiséry proti *B. pertussis*.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Nejméně deset zdravých myší o hmotnosti 14 g až 16 g se použije pro skupinu zkoušenou i kontrolní. Myši jsou stejného pohlaví nebo obě pohlaví jsou ve skupinách rovnoměrně zastoupena. Zvířata mají mít přístup k potravě a vodě po celou zkoušku a nejméně 2 h před jejím začátkem. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml tak, aby dávka obsahovala množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se vstříkne 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího pokud možno stejné množství protimikrobní konzervační látky, které bylo podáváno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak 72 h a 7 dní po podání. Vakcína vyhovuje požadavkům zkoušky jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost skupiny očkovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek hmotnosti očkovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti myší kontrolních a c) během zkoušky neuhyne více než 5 % očkovaných myší.

Volný formaldehyd. Po inaktivaci formaldehydem vakcína vyhovuje požadavkům uvedeným v článku *Vaccina ad usum humanum*.

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Provede se stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (*2.7.7*).

Stanovená účinnost je nejméně 4 m.j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti (P = 0,95) stanovené účinnosti je nejméně 2 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:
- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce,
- že přípravek se před použitím roztřepe,
- že přípravek nesmí zmrznout.

Vaccinum pertussis adsorbatum

Adsorbovaná vakcína proti dávivému kašli

Je to sterilní suspenze inaktivovaných celých buněk jednoho nebo více kmenů *Bordetella pertussis* ve fyziologickém roztoku, ke které byl přidán hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý.

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Použije se jeden nebo více kmenů mikroba *B. pertussis* známého původu a udržování. Kmeny, živná půda a kultivační metoda se volí tak, aby v hotovém přípravku byly zastoupeny aglutinogeny 1, 2 a 3. Každý kmen se pěstuje 24 h až 72 h v tekuté půdě nebo na pevné půdě; půda použitá při posledním kultivačním stupni neobsahuje krev nebo krevní deriváty. Lidská krev ani krevní deriváty z ní připravené se v živných půdách nepoužijí. Bakterie se sklidí, promytím se odstraní příměsi pocházející z živné půdy a bakterie se suspendují v roztoku chloridu sodného (9 g/l) nebo v jiném vhodném izotonickém roztoku. Denzita suspenze se stanoví nejpozději dva týdny po sklizni porovnáním s mezinárodním referenčním preparátem denzity a takto získaná hodnota se použije jako základ pro výpočet v následujících krocích při přípravě vakcíny. Hodnotu mezinárodního referenčního přípravku v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Jednotlivé sklizně se nepoužijí pro konečnou várku vakcíny, pokud nebylo prokázáno, že obsahují buňky *B. pertussis* se stejnými vlastnostmi, pokud jde o růst a aglutinogeny, jako původní kmen a že nejsou kontaminovány bakteriemi a houbami. Bakterie se usmrtí a detoxikují za kontro-

lovaných podmínek buď vhodnou chemickou látkou, nebo teplem, nebo kombinací těchto dvou metod. Nepřítomnost živých mikrobů *B. pertussis* se zkouší za použití vhodné živné půdy. Suspenze se uchovává po vhodnou dobu při (5 ± 3) °C, aby se snížila její toxicita.

Konečná várka vakcíny

Vhodná množství již inaktivovaných jednotlivých sklizní se smíchají a připraví se konečná várka vakcíny. K suspenzi buněk se přidá hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý. Je možno přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Koncentrace bakterií v konečné várce by neměla přesahovat koncentraci odpovídající denzitě 20 m.j. na jednu lidskou dávku. Pokud se použijí dva nebo více kmenů *B. pertussis*, je složení šarží vycházejících z konečné várky vakcíny stejné, pokud jde o zastoupení každého kmene vyjádřené v jednotkách denzity.

K přípravě šarže se použije konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látka. 85 % až 115 % zamýšleného množství; pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná ve stati Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkoušky specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkouška totožnosti

Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a odstředěním se získá sediment obsahující bakterie. Je možno použít i jiné vhodné metody oddělení bakterií od nosiče. Totožnost přípravku se prokáže aglutinací bakterií v resuspendovaném sedimentu specifickými antiséry proti *B. pertussis* nebo zkouškou popsanou ve stati Stanovení účinnosti.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Nejméně deset zdravých myší hmotnosti 14 g až 16 g se použije pro skupinu zkoušenou i kontrolní. Myši mají být stejného pohlaví nebo mají být obě pohlaví ve skupinách rovnoměrně zastoupena. Zvířata mají mít přístup k potravě a vodě po celou zkoušku a nejméně 2 h před jejím začátkem. Každé myši ze zkoušené skupiny se intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml tak, aby dávka obsahovala množství vakcíny odpovídající nejméně polovině jedné lidské dávky. Každé myši z kontrolní skupiny se vstříkne 0,5 ml sterilního roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) obsahujícího pokud možno stejné množství protimikrobní konzervační látky, které bylo podáváno ve vakcíně. Obě skupiny se zváží těsně před začátkem zkoušky a pak za 72 h a za 7 dní po podání. Vakcína vyhovuje požadavkům zkoušky jestliže: a) po 72 h není celková hmotnost skupiny očkovaných myší menší než před zkouškou, b) po sedmi dnech není průměrný přírůstek

hmotnosti očkovaných myší menší než 60 % průměrného přírůstku hmotnosti myší kontrolních a c) během zkoušky uhyne nejvýše 5 % očkovaných myší.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Volný formaldehyd. Po inaktivaci formaldehydem přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Provede se stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli (*2.7.7*).

Stanovená účinnost je nejméně 4 m.j. v jedné lidské dávce a dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 2 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se dále uvede:
- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce,
- název a množství nosiče,
- že přípravek se před použitím roztřepe,
- že přípravek nesmí zmrznout.

Vaccinum pestis classicae suillae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti klasickému moru prasat lyofilizovaná

Je to přípravek z kmene viru klasického moru prasat, který ztratil svoji patogenitu pro prasata pasážováním v buněčných kulturách nebo na králících.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Pro vakcíny připravené na králících se inokulum (nebo vakcína) získává z homogenizovaných orgánů nebo z krve králíků pocházejících ze zdravých chovů, kteří se usmrtí při nejvyšším vzestupu teploty po intravenózním podání viru. Vakcína se lyofilizuje.

Výběr vakcinačního kmene

Pouze virový kmen, který je prokazatelně uspokojivý z hlediska následujících charakteristik, se může použít k přípravě vakcíny: bezpečnost, nepřenosnost, nevratnost oslabení a imunogenní vlastnosti. K průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Vakcinační dávky použité ve všech následujících zkouškách jsou stanoveny výrobcem na základě předpokusů.

Zkoušky na prasatech

Výběr zvířat. Selata jsou ve stáří 6 až 7 týdnů; prasnice jsou prvničky. Všechna zvířata jsou zdravá a neměla kontakt s virem moru prasat. Sérologicky jsou prosta protilátek proti moru prasat a proti virové diarei skotu (BVD). Návykový čas na ustájovací prostor, ve kterém mají být zkoušky prováděny, je 1 týden.

Bezpečnost.

a) Každému z pěti selat se intramuskulárně vstříkne v jedné injekci desetinásobná vakcinační dávka (skupina a).

b) Pět selat je 5 po sobě jdoucích dní imunosuprimováno denně dávkou 2 mg prednisolonu na kg živé hmotnosti; třetí den se selatům podá jedna dávka vakcíny (skupina b).

Zvířata skupin (a) a (b) se pozorují po dobu 21 dnů. Zůstanou v dobrém zdravotním stavu; jejich teplotní a váhová křivka se signifikantně neliší od kontrolní skupiny.

c) Deset neimunních březích prasnic se intramuskulárně navakcinuje mezi 24. a 35. dnem březosti, každá dvěma vakcinačními dávkami jednorázově. Dalším deseti neimunním březím prasnicím stejného stáří a ze stejného chovu se podá místo dvou vakcinačních dávek vakcíny stejný objem roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Vakcinační virus nevyvolá abnormality během březosti nebo u selat.

Nepřenosnost. Dvanáct selat stejného původu je ustájeno společně. Šest z nich se obvyklým způsobem vakcinuje, ostatních šest se chová jako kontaktní kontroly. Za 40 dní se všechna zvířata čelenžují intramuskulárně dostatečným množstvím čelenžního viru (viz Stanovení účinnosti), které usmrtí neočkované sele během 7 dnů. Vakcinovaná selata infekci odolají, zatím co kontaktní kontroly jeví typické příznaky moru prasat.

Nevratnost oslabení. Každému ze dvou selat se intramuskulárně vstříkne jedna vakcinační dávka. Za 7 dnů po podání se každému odebere 5 ml krve a vzorky krve se smíchají. Vždy 5 ml této krve se intramuskulárně vstříkne dalším dvěma selatům. Tento postup se opakuje šestkrát. Zvířata nemají příznaky moru prasat a vykazují normální vzrůst.

Imunogenní vlastnosti. Imunogenní vlastnosti se mohou prokázat metodou popsanou pro stanovení účinnosti. Množství viru odpovídající jedné vakcinační dávce obsahuje nejméně 100 PD_{50}.

Zkoušky totožnosti

A. U vakcín připravených z králíků a takových, které pocházejí z králičích buněčných kultur, se intravenózně vstříkne 0,5 ml vakcíny rekonstituované podle údajů v označení jednomu nebo více neimunizovaným králíkům. Právě tak se imunizuje jeden nebo více králíků, kteří buď nejméně 10 dnů, nejvýše však 2 měsíce před tím byli imunizováni stejným způsobem a stejnou dávkou vakcíny téhož typu, nebo byli imunizováni několik hodin před aplikací vakcíny podáním dostatečné dávky imunního séra. Ráno a večer se králíkům měří tělesná teplota, počínaje 24 hod po aplikaci, denně až do pátého dne po aplikaci. Vakcína je identifikována svými specifickými, teplotu způsobujícími vlastnostmi, které jen u neimunních králíků způsobí vzestup teploty nejméně o 1,5 °C.

B. U vakcín z buněčných kultur, které nejsou připravovány z králíků, sérum z prasat imunizovaných vakcínou neutralizuje virus používaný k výrobě vakcíny.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použijí se tři selata vyhovující požadavkům předepsaným pro volbu zvířat v odstavci Výběr vakcinačního kmene. Každému seleti se intramuskulárně vstříkne v jedné injekci deset dávek rekonstituované vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dnů. Teplotní křivka zůstává normální a zvířata zůstávají zjevně zdravá a vykazují normální růst.

Cizí viry. Vakcína se smíchá s monospecifickým antisérem a inokuluje se do vhodných buněčných kultur. Nevytvoří se cytopatický efekt. Provede se hemaglutinační zkouška ze supernatantu tkáňových kultur při použití kuřecích červených krvinek. Výsledek je negativní. Rovněž provedená hemadsorpční zkouška na buněčných kulturách je negativní.

Vakcína se naředí tak, že 1 dávka je obsažena v 1 ml. Deseti myším hmotnosti 11 g až 15 g se intracerebrálně vstříkne 0,03 ml rekonstituované vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dnů. Pokud během prvních 48 h po podání uhyne více než dvě myši, zkouška se opakuje. Myši nevykazují v době 3 až 21 dnů po podání žádné abnormality, jež by bylo možno přisoudit vakcíně.

Bakterie a houby. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Stanovení účinnosti

Účinnost se vyjadřuje jako počet dávek, které prasatům poskytují 50% ochranu (PD_{50}) a jsou obsaženy ve vakcinační dávce uvedené v označení. Vakcína obsahuje nejméně 100 PD_{50} ve vakcinační dávce.

Ke zkoušce se použijí selata, která vyhovují požadavkům na volbu zvířat popsaným v odstavci Výběr vakcinačního kmene. Dvěma skupinám po pěti selatech se intramuskulárně vstříkne:
- 1/40 dávky vakcíny každému seleti prvé skupiny,
- 1/160 dávky vakcíny každému seleti druhé skupiny.

Dvě selata slouží jako kontroly. Ředění se připraví pomocí *tlumivého roztoku fyziologického o pH 7,2.* Za 14 dní se každému imunizovanému i kontrolnímu zvířeti intramuskulárně vstříkne dávka čelenžního viru dostačující k tomu, aby nevakcinované sele uhynulo v průběhu 7 dnů po čelenži. Čelenžní virový materiál pozůstává z krve prasat, která byla infikována experimentálně virem, jenž nebyl pasážován na buněčných kulturách. Kontrolní zvířata uhynou v průběhu 7 dnů po čelenži. Imunizovaná zvířata se pozorují 14 dnů. Z počtu zvířat, která přežijí bez příznaků moru prasat, se vhodnou statistickou metodou vypočítá počet PD_{50} obsažených ve vakcíně.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede, zda byla vakcína připravena v buněčných kulturách nebo na králících.

Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum

Polysacharidová vakcína proti pneumokokům

Je to směs stejných podílů purifikovaných antigenů pouzderného polysacharidu připravených z vhodných patogenních kmenů bakterie *Streptococcus pneumoniae*, jejichž pouzdra prokazatelně obsahují polysacharidy, které jsou schopné u člověka vyvolat tvorbu dostatečných hladin specifických protilátek. Vakcína obsahuje dvacet tři imunochemicky odlišných pouzderných polysacharidů, které jsou uvedeny v tabulce 1.

Vakcína je čirá, bezbarvá tekutina.

Výroba

Výroba je založena na systému jednotné inokulace, odděleně pro každý typ polysacharidu. Výrobní postup prokazatelně poskytuje stále stejnou vakcínu přiměřené bezpečnosti a imunogenity pro člověka.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že přípravek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a humánních vakcín (*2.6.9*) takto přizpůsobené pro morčata: každému z deseti morčat se vstříkne po deseti lidských dávkách a pozorují se 12 dní.

Monovalentní nerozplněné množství polysacharidu

Bakterie se pěstují ve vhodné tekuté živné půdě, která neobsahuje antigenní substance krevních skupin nebo vysokomolekulární polysacharidy. Ověří se bakteriální čistota kultury a kultura se inaktivuje fenolem. Nečistoty se odstraní takovými technikami, jako frakční precipitací, enzymatickým štěpením nebo ultrafiltrací. Polysacharid se získá frakční precipitací, promyje se a vysuší ve vakuu na takový obsah zbytkové vlhkosti, který je prokazatelně vhodný pro stabilitu polysacharidu. Obsah zbytkové vlhkosti se stanoví sušením za sníženého tlaku nad oxidem fosforečným nebo termogravimetrickou analýzou a získaná hodnota se použije pro výpočet výsledků dále uvedených zkoušek, které odkazují na vysušenou látku. Nerozplněné monovalentní polysacharidy se uchovávají při vhodné teplotě a za podmínek, které brání zvlhnutí.

Pouze monovalentní nerozplněné polysacharidy, které vyhovují následujícím požadavkům, se mohou použít k přípravě konečné várky vakcíny. Obsahy jednotlivých složek v procentech, stanovené níže popsanými metodami, jsou uvedeny v tabulce 1.

Bílkovina (*2.5.16*).

Nukleové kyseliny (*2.5.17*).

Celkový dusík (*2.5.9*).

Fosfor (*2.5.18*).

Velikost molekul. Stanoví se chromatografií na molekulárním sítu (*2.2.30*) za použití *agarosy síťované pro chromatografii R* nebo *agarosy síťované pro chromatografii R1*.

Uronové kyseliny (*2.5.22*).

Hexosaminy (*2.5.20*).

Methylpentosy (*2.5.21*).

O-Acetyl skupiny (*2.5.19*).

Zkouška totožnosti (*2.7.1*). Totožnost monovalentního nerozplněného polysacharidu se potvrdí dvojitou imunodifuzí nebo elektroimunodifuzí (kromě polysacharidů 7F, 14 a 33F) za použití specifických antisér.

Tab. 1. Obsah složek monovalentních nerozplněných polysacharidů v procentech

Molekulový typ	Bílkoviny	Nukleové kyseliny	Celkový dusík	Fosfor	Molekulová velikost (K) **	***	Uronové kyseliny	Hexosaminy	Methylpen-tosy	O-acetyl skupiny
1	≤ 2	≤ 2	3,5 - 6	0 - 1,5	≤ 0,15		≥ 45			≥ 1,8
2	≤ 2	≤ 2	0 - 1	0 - 1,0	≤ 0,15		≥ 15		≥ 38	
3	≤ 5	≤ 2	0 - 1	0 - 1,0	≤ 0,15		≥ 40			
4	≤ 3	≤ 2	4 - 6	0 - 1,5	≤ 0,15			≥ 40		
5	≤ 7,5	≤ 2	2,5 - 6,0	≤ 2		≤ 0,60	≥ 12	≥ 20		
6B	≤ 2	≤ 2	0 - 2	2,5 - 5,0		≤ 0,50			≥ 15	
7F	≤ 5	≤ 2	1,5 - 4,0	0 - 1,0	≤ 0,20				≥ 13	
8	≤ 2	≤ 2	0 - 1	0 - 1,0	≤ 0,15		≥ 25			
9N	≤ 2	≤ 1	2,2 - 4	0 - 1,0	≤ 0,20		≥ 20	≥ 28		
9V	≤ 2	≤ 2	0,5 - 3	0 - 1,0		≤ 0,45	≥ 15	≥ 13		
10A	≤ 7	≤ 2	0,5 - 3,5	1,5 - 3,5		≤ 0,65		≥ 12		
11A	≤ 3	≤ 2	0 - 2,5	2,0 - 5,0		≤ 0,40				≥ 9
12F	≤ 3	≤ 2	3 - 5	0 - 1,0	≤ 0,25			≥ 25		
14	≤ 5	≤ 2	1,5 - 4	0 - 1,0	≤ 0,30			≥ 20		
15B	≤ 3	≤ 2	1 - 3	2,0 - 4,5		≤ 0,55		≥ 15		
17F	≤ 2	≤ 2	0 - 1,5	0 - 3,5		≤ 0,45			≥ 20	
18C	≤ 3	≤ 2	0 - 1	2,4 - 4,9	≤ 0,15				≥ 14	
19A	≤ 2	≤ 2	0,6 - 3,5	3,0 - 7,0	≤ 0,45			≥ 12	≥ 20	
19F	≤ 3	≤ 2	1,4 - 3,5	3,0 - 5,5	≤ 0,20			≥ 12,5	≥ 20	
20	≤ 2	≤ 2	0,5 - 2,5	1,5 - 4,0		≤ 0,60		≥ 12		
22F	≤ 2	≤ 2	0 - 2	0 - 1,0		≤ 0,55	≥ 15		≥ 25	
23F	≤ 2	≤ 2	0 - 1	3,0 - 4,5	≤ 0,15				≥ 37	
33F	≤ 2,5	≤ 2	0 - 2	0 - 1,0		≤ 0,50				

* Jednotlivé typy polysacharidů jsou označeny podle dánské nomenklatury.
** *agarosa síťovaná pro chromatografii R*
*** *agarosa síťovaná pro chromatografii R1*

Specifita. Antigeny při zkoušení nereagují s žádným antisérem specifickým pro ostatní polysacharidy vakcíny, včetně faktorových sér pro rozlišení jednotlivých typů v rámci skupin. Polysacharidy se zkoušejí v koncentraci 50 µg/ml metodou schopnou rozlišit koncentraci 0,5 µg/ml.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny vznikne smícháním vysušených různých polysacharidů za aseptických podmínek. Homogenní směs se asepticky rozpustí ve vhodném izotonickém roztoku tak, aby jedna lidská dávka 0,5 ml obsahovala 25 µg každého polysacharidu. Může se přidat protimikrobní konzervační látka. Roztok se sterilizuje filtrací přes filtr zachycující bakterie.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům se může použít k přípravě šarže.

Protimikrobní konzervační látka. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah je 85 % až 115 % zamýšleného množství.

Sterilita (*2.6.1*). Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů.

Pouze šarže, která vyhovuje všem dále uvedeným požadavkům v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu, Stanovení obsahu se může uvolnit k použití. Pokud byla stanovení obsahu fenolu a protimikrobní konzervační látky provedena s vyhovujícím výsledkem u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit. Jestliže byla na vhodném počtu po sobě následujících šarží prokázána konzistentnost výroby, může se stanovení obsahu nahradit kvalitativní zkouškou, která prokáže totožnost každého polysacharidu, a to pokud bylo stanovení obsahu provedeno u každého monovalentního nerozplněného polysacharidu použitého k přípravě šarže vakcíny.

Zkouška totožnosti

Stanovení obsahu slouží rovněž jako průkaz totožnosti vakcíny.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH (*2.2.3*). 4,5 až 7,4.

Protimikrobní konzervační látka. Pokud je třeba, stanoví se množství protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou. Obsah není nižší než nejnižší prokazatelně účinné množství a vyšší než 115 % hodnoty uvedené v označení.

Fenol (*2.5.15*). Nejvýše 2,5 g/l.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Pyrogenní látky (*2.6.8*). Vyhovuje ve zkoušce na pyrogenní látky, při níž se na 1 kg hmotnosti králíka vstříkne 1 ml zředěné vakcíny obsahující od každého polysacharidu 2,5 µg/ml.

Stanovení obsahu

Obsah jednotlivých polysacharidů se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*), při níž se použijí specifická antiséra proti všem polysacharidům obsaženým ve vakcíně, včetně faktorových sér pro typizaci uvnitř jednotlivých skupin, a jednotlivé purifikované polysachridy jako standardy.

Vakcína obsahuje 70 % až 130 % množství uvedeného pro každý polysacharid v označení. Interval spolehlivosti (P = 0,95) stanovení je v rozmezí 80 % až 120 %.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek Vaccina ad usum humanum.

V označení se uvede:

- množství každého jednotlivého polysacharidu v jedné lidské dávce udané v mikrogramech,
- celkové množství polysacharidů v obale.

Vaccinum poliomyelitidis inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti poliomyelitidě

Je to vodná suspenze vhodných kmenů poliomyelitického viru typu 1, typu 2 a typu 3 pomnožených ve vhodných buněčných kulturách a inaktivovaných vhodnou metodou. Je to čirá tekutina.

Výroba

Výroba je založena na systému jednotné inokulace a virus v konečné vakcíně představuje ve výrobě vakcíny nejvýše desátou subkulturu od matečného inokula, s nímž se provedly laboratorní a klinické zkoušky prokazující vhodnost kmene.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že bude-li výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Do média pro počáteční buněčný růst se může přidat zvířecí sérum, ale udržovací médium při pomnožování viru neobsahuje žádné bílkoviny. Koncentrace séra v konečné vakcíně nepřesahuje jednu miliontinu. Médium může obsahovat vhodný indikátor pH, jako je červeň fenolová, a vhodná antibiotika v nejmenších účinných koncentracích.

Každá virová suspenze se zkouší na totožnost, bakteriální sterilitu a po neutralizaci specifickým antisérem také na nepřítomnost cizích virů. Virová suspenze se filtruje vhodným filtrem a může se koncentrovat a purifikovat. Suspenze má v mililitru obsahovat nejméně $1 \cdot 10^7$ $CCID_{50}$ každého typu viru.

Ve vhodnou dobu po poslední filtraci, nejlépe za 24 h, se přidají vhodné chemické látky, které inaktivují filtrovaný virus, aniž by poškodily jeho antigenitu. Při inaktivaci se provede vhodná filtrace, a je-li třeba, inaktivační látka se později neutralizuje.

Vhodnými zkouškami na buněčných kulturách se prokáže, že každá z monovalentních suspenzí je prostá infekčního poliomyelitického viru a jiných lidských a opičích virů. Trivalentní vakcína se připraví smícháním jednotlivých monovalentních suspenzí. Před přidáním jakékoliv protimikrobní konzervační látky se prokáže, že trivalentní suspenze je prosta infekčního poliomyelitického viru a jiných lidských a opičích virů.

Zkouška totožnosti

Podána vnímavým zvířatům podporuje vakcína tvorbu neutralizačních protilátek proti poliomyelitickému viru typu 1, typu 2 a typu 3.

Zkouška na čistotu

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Vakcína se zředí vhodným tlumivým roztokem dvacetkrát, stokrát a pětsetkrát. Ve skupinách po deseti třítýdenních kuřatech nebo deseti morčatech o hmotnosti 250 g až 350 g se nitrosvalově vstříkne každému zvířeti po 0,5 ml ředění vakcíny. Na každé ředění se použije jedna skupina zvířat. Pátý až šestý den po podání se zvířata vykrvácí a připraví se jednotlivá séra, která se ve zředění 1 : 4 vyšetří na přítomnost neutralizačních protilátek proti poliomyelitickým virům typu 1, typu 2 a typu 3.

Smíchá se 100 $CCID_{50}$ viru se zředěným sérem a inkubuje se 4 h 30 min až 6 h při 37 °C. Potom se nechá 12 h až 18 h stát při (5 ± 3) °C. Směsi se naočkují do buněčných kultur ke zjištění viru, který nebyl zneutralizován, a výsledky se odečtou za 7 dní po naočkování. Pro každou skupinu se zaznamenají počty sér s neutralizačními protilátkami a vypočítá se ředění vakcíny, které u 50 % zvířat poskytne protilátkovou odpověď.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže stonásobné nebo vyšší ředění vyvolá protilátkovou odpověď proti všem třem typům viru u 50 % zvířat.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Vaccinum poliomyelitidis perorale

Živá vakcína proti poliomyelitidě perorální

Synonymum. Živá očkovací látka proti dětské obrně

Je to přípravek obsahující schválené kmeny živého oslabeného polyomyelitického viru typu 1, 2 nebo 3 pomnožené *in vitro* v kulturách schválených buněk. Obsahuje buď jeden typ, nebo kombinaci tří typů kmenů podle Sabina, upravených do formy vhodné pro perorální podání.

Je to čirá tekutina, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

Výroba

Vakcinační kmeny a výrobní postup prokazatelně poskytují stále stejné vakcíny, které jsou imunogenní a bezpečné pro člověka.

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace. Buněčné linie se používají podle systému buněčné banky. Při použití primárních buněk opičích ledvin vyhovuje výroba požadavkům dále uvedeným. Pokud není určeno a schváleno jinak, neprojde virus v konečném přípravku více než dvěma pasážemi od matečného inokula.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude přípravek zkoušen, vyhoví ve zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Substrát pro pomnožení viru

Virus se pomnožuje v lidských diploidních buňkách *(5.2.3)*, v kontinuálních buněčných liniích nebo v buňkách opičích ledvin. Kontinuální buněčné linie schvaluje oprávněná autorita.

Primární opičí buňky. *Následující speciální požadavky pro substrát pro pomnožení viru se vztahují na primární opičí buňky.*

Opice použité pro přípravu kultur ledvinových buněk a pro zkoušení viru. Připravuje-li se vakcína v kulturách buněk opičích ledvin, jsou zvířata druhu schváleného oprávněnou autoritou zcela zdravá a nebyla dříve použita k žádným pokusům.

Opice se chovají v dobře postaveném zvěřinci s odpovídající ventilací v prostorných a oddělených klecích, umístěných co nejdále od sebe. Přijmou se odpovídající opatření k zabránění přenosu infekce mezi klecemi. Do jedné klece se umístí nejvýše dvě opice a obsazení klecí se nemění. V zemi výroby vakcíny se opice drží v karanténě nejméně 6 týdnů před použitím. Karanténní skupina je skupina vybraných zdravých opic chovaných v jedné místnosti se zvláštním režimem krmení a úklidu, která v karanténním období nemá styk s jinými opicemi. Když během karanténního období dojde k úhynu převyšujícímu 5 % v zásilce obsahující jednu nebo více skupin, opice z celé zásilky setrvávají v karanténě nejméně 6 dalších týdnů. Výjimkou je úhyn po nehodě, nebo tam, kde byla příčina specifikována, že není infekčním onemocněním. Jednotlivé skupiny se drží nepřetržitě v izolaci jako v karanténě, a to i po dokončení karanténního období, až do použití opic. Po odebrání poslední opice ze skupiny se místnost před použitím pro další skupinu vyčistí a dekontaminuje. Jestliže se použijí ledviny plodů, chovají se matky v karanténě po dobu březosti.

Opice, jejichž ledviny se mají vyjmout, se anestezují a pečlivě vyšetří na příznaky tuberkulózy a infekce cerkopitecidním herpesvirem 1 (B virus).

Jestliže opice vykazují nějaké patologické léze, závažné z hlediska použití jejich ledvin v přípravě inokula nebo vakcíny, nemohou se použít. Ani ostatní opice z karanténní skupiny se nemohou použít, pokud není zřejmé, že jejich použití neohrozí bezpečnost přípravku.

Všechny postupy uvedené v tomto oddíle se provádějí mimo objekt, v němž se vybírá vakcína.

Použité opice jsou prokazatelně bez protilátek proti viru SV 40 a viru opičí imunodeficience. Jestliže se pro výrobu použije druh *Macaca*, opice nemají prokazatelně ani protilátky proti cerkopitecidnímu herpesviru 1 (B virus). Jako indikátor nepřítomnosti protilátek proti viru B se používá lidský herpesvirus pro nebezpečí při zacházení s cerkopitecidním 1 virem (B virus).

Kultury buněk opičích ledvin pro výrobu vakcíny. Pro přípravu buněčných kultur se použijí pouze ledviny bez patologických známek. Jestliže jsou opice ze skupiny určené pro výrobu vakcíny, mohou se použít pro pomnožení viru sériově pasážované kultury buněk opičích ledvin z primárních buněk opičích ledvin, jinak se buňky opičích ledvin sériově nepasážují. Virus pro přípravu vakcíny se v takových kulturách pomnožuje asepticky. Pro růst buněk se může použít zvířecí sérum, po inokulaci viru se používá udržovací médium bez séra.

Každá skupina buněčných kultur připravených z jednotlivé opice nebo ze skupiny nejvýše deseti plodů se připravuje a zkouší samostatně.

Virové inokulum

Použité kmeny poliovirů jsou určeny podle průvodních záznamů, které obsahují informace o jejich původu a následné manipulaci s nimi.

Pracovní inokula se připraví jedinou pasáží z matečného inokula a ve schválené úrovni pasáží od originálního Sabinova viru. Inokula se připraví ve velkých množstvích a uchovávají se při teplotě nižší než -60 °C.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro pomnožování viru.

Zkouška totožnosti. Každé pracovní inokulum se identifikuje jako poliovirus daného typu za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Stanoví se dále popsanou metodou. Virová koncentrace je základ pro množství viru použitého ve zkoušce Neurovirulence.

Cizí agens *(2.6.16).* Jestliže je pracovní inokulum produkováno v lidských diploidních buňkách (*5.2.3*) nebo v kontinuální buněčné linii, vyhovuje požadavkům na inokulum pro virové vakcíny. Jestliže je pracovní inokulum produkováno v buňkách primárních opičích buněk, vyhovuje požadavkům dále uvedeným v odstavcích Pomnožování a sklizeň viru a Monovalentní spojená sklizeň a zkouškám na dospělých myších, sajících myších a na morčatech uvedeným ve stati Důkaz cizích agens v humánních virových vakcínách (*2.6.16*).

Neurovirulence (*2.6.19*). Každé matečné a pracovní inokulum vyhovuje zkoušce neurovirulence pro vakcínu proti poliomyelitidě (perorální). Nad to se zastaví používání pracovního inokula ve výrobě vakcíny, jestliže výskyt nedostatků z něho vyrobených monovalentních spojených sklizní je větší, než je předpovězeno statisticky. Referenční přípravky tří typů polioviru ze Sabinova originálu a dvou pasáží jsou k dosažení pro použití ve Světové zdravotnické organizaci, Ženeva, Švýcarsko.

Tato statistická předpověď se vypočítá po každé zkoušce na základě všech zkoušených monovalentních spojených sklizní; je stejná pravděpodobnost falešného odmítnutí v případě první zkoušky (tj. 1 %), pravděpodobnost falešného odmítnutí v případě nové zkoušky bývá zanedbatelná. Je-li tato zkouška prováděna pouze výrobcem, zkušební skla se poskytnou kontrolní autoritě k ohodnocení.

Genetické markery. Každé pracovní virové inokulum se zkouší na replikační vlastnosti při 36 °C až 40 °C, jak je popsáno v odstavci Monovalentní spojené sklizně.

Pomnožování a sklizeň viru

Všechny práce s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami se provádějí v aseptických podmínkách a v prostředí, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do růstových médií se může použít schválené zvířecí sérum (ale ne lidské), avšak konečné udržovací médium pro buňky v době pomnožování viru neobsahuje zvířecí sérum. Sérum a trypsin použité k přípravě buněčných suspenzí a médií prokazatelně neobsahují živá cizí agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je červeň fenolová, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Přednostně se používá při výrobě substrát bez antibiotik. Nejméně 5 % a nejvýše 1000 ml buněčných kultur použitých při výrobě vakcíny se ponechává jako neinfikované buněčné kultury (kontrolní buňky); speciální požadavky, uvedené dále, se vztahují k výrobě vakcíny na primárních opičích buňkách. Virová suspenze se sklidí nejpozději 4 dny po inokulaci viru. Po inokulaci výrobní buněčné kultury pracovním inokulem se inokulované buňky udržují při stanovené teplotě, jež byla prokázána jako vhodná v rozmezí 33 °C až 35 °C. Teplota se udržuje neměnná, s odchylkou ±0,5 °C. Kontrolní buňky se inkubují při 33 °C až 35 °C po přiměřenou dobu inkubace.

Pouze sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě monovalentní spojené sklizně.

Koncentrace viru. Koncentrace viru ve virových sklizních se stanoví, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, ke sledování pravidelnosti výroby a k výpočtu ředění, které se použije do konečné várky vakcíny.

Cizí agens *(2.6.16).*

Kontrolní buňky. Kontrolní buňky produkční buněčné kultury, ze které se sklízí virus, vyhovují ve zkoušce totožnosti a požadavkům na cizí agens *(2.6.16)* nebo, při použití primárních opičích buněk, dále uvedenému.

Primární opičí buňky. *Následující speciální požadavky se vztahují k pomnožování viru v primárních opičích buňkách a k jeho sklizni.*

Buněčné kultury. V den inokulace virovým inokulem se buněčné kultury vyšetří na degeneraci způsobenou infekčním agens. Jestliže se při prohlížení zjistí přítomnost cizího agens v některé buněčné kultuře, vyřadí se celá skupina kultur.

V den inokulace virovým pracovním inokulem se odebere vzorek nejméně 30 ml směsné tekutiny z buněčných kultur z ledvin z každé jednotlivé opice nebo ze skupiny nejvýše deseti opičích plodů. Vzorek se rozdělí na dvě části. Jedna část směsných tekutin se zkouší na kulturách buněk opičích ledvin připravených z téhož druhu, jaký se použil pro přípravu vakcíny, ale z jiného zvířete. Druhá část vzorku směsných tekutin se v případě nutnosti zkouší na kulturách buněk opičích ledvin z jiného druhu tak, aby alespoň jeden ze zkoušených vzorků byl zkoušen na kulturách buněk z opic citlivých k viru SV40. Směsný vzorek se inokuluje do lahví s těmito buněčnými kulturami tak, aby ředění směsné tekutiny živným médiem nebylo vyšší než 1 : 4. Plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm^2 na mililitr směsné tekutiny. Nejméně jedna láhev každého druhu buněčné kultury zůstává bez inokulace a slouží jako kontrola. Jestliže je pro výrobu vakcíny použit druh opice, která je citlivá na SV40, zkouška na jiném druhu opice se nepožaduje. Pro pomnožování buněk se může použít zvířecí sérum za předpokladu, že neobsahuje protilátky proti SV40. Udržovací médium používané po inokulaci zkoušeného materiálu neobsahuje sérum, s výjimkou dále uvedenou.

Buněčné kultury se inkubují při teplotě mezi 35 °C a 37 °C a pozorují se po celou dobu nejméně 4 týdnů. Během doby sledování a po nejméně 2 týdnech inkubace se z roztoku založí další subkultura na témže buněčném systému. Tyto subkultury se také pozorují nejméně 2 týdny.

Při pasážování subkultur se na původní kultury může přidat sérum, pokud toto sérum neobsahuje protilátky proti SV40.

Pro detekci viru SV40 a ostatních virů v buňkách mohou být užitečné techniky využívající fluorescenční protilátky.

Další vzorek nejméně 10 ml směsné tekutiny se zkouší na přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (B virus) a na přítomnost ostatních virů v kulturách buněk králičích ledvin. Sérum používané v růstovém médiu pro tyto kultury má být prokazatelně prosté inhibitorů viru B. Jako indikátor nepřítomnosti inhibitorů viru B se používá lidský herpesvirus pro nebezpečí při zacházení s cerkopitecidním herpesvirem 1 (B virem). Vzorek se inokuluje do láhví s těmito buněčnými kulturami tak, aby ředění směsné tekutiny růstovým médiem nebylo vyšší než 1 : 4. Plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm^2 na mililitr směsné tekutiny. Nejméně jedna láhev buněčné kultury zůstává bez inokulace a slouží jako kontrola.

Kultury se inkubují při 35 °C až 37 °C a pozorují se nejméně 2 týdny.

Další vzorek 10 ml směsné tekutiny se z buněčné kultury přemístí v den inokulace virovým inokulem a zkouší se na přítomnost cizích agens inokulací na lidské buněčné kultury citlivé na virus spalniček.

Tyto zkoušky lze hodnotit pouze v případě, jestliže nejvýše 20 % lahví s kulturami bylo vyřazeno pro náhodné nespecifické důvody do konce vlastní zkušební doby.

Jestliže se při těchto zkouškách najde důkaz přítomnosti nějakého cizího agens, je jednotlivá sklizeň ze skupiny buněčných kultur vyřazena.

Jestliže se prokáže přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (B virus), výroba perorální vakcíny proti poliomyelitidě se přeruší a informuje se oprávněná autorita. Výroba se neobnoví, dokud se neuzavře vyšetřování a nepřijmou se opatření proti jakémukoliv znovuobjevení infekce. Obnovení výroby schválí oprávněná autorita.

Jestliže tyto zkoušky nejsou prováděny bezprostředně, vzorky směsné tekutiny z kultur se uchovávají při teplotách -60 °C nebo nižších teplotách, s výjimkou vzorku pro zkoušku na B virus, který se uchovává při 4 °C po dobu nejvýše 7 dní po odběru.

Kontrolní buněčné kultury. V den inokulace virovým pracovním inokulem se 25 % (ale nejvýše 2,5 l) buněčné suspenze pocházející z ledvin jednotlivých opic nebo z nejvýše deseti plodů opic ponechá jako neinokulované kontrolní buněčné kultury. Tyto kontrolní buněčné kultury se kultivují nejméně 2 týdny za stejných podmínek jako kultury inokulované a během této doby se vyšetřují na výskyt cytopatických změn. Zkoušky lze hodnotit, jestliže nejvýše 20 % kontrolních buněčných kultur bylo vyřazeno pro náhodné nespecifické důvody.

Na konci doby sledování se kontrolní buňky vyšetří na degeneraci způsobenou nějakým infekčním agens. Jestliže toto vyšetření nebo některá ze zkoušek požadovaných v tomto odstavci prokáže v kontrolní kultuře známky přítomnosti nějakého cizího agens, vyřadí se poliovirus rostoucí na inokulovaných kulturách z této skupiny.

Zkoušky na hemadsorbující viry. V době sklizně viru nebo 4 dny po inokulaci výrobních kultur virovým pracovním inokulem se odebere vzorek o velikosti 4 % kontrolních buněčných kultur a zkouší se na hemadsorbující viry. Na konci sledovaného období se podobně zkoušejí zbývající buněčné kultury. Tyto zkoušky se provádějí, jak je popsáno ve stati Důkaz cizích agens v lidských virových vakcínách (*2.6.16*).

Zkoušky na ostatní cizí agens. V době sklizně nebo 7 dní po inokulaci výrobních kultur virovým pracovním inokulem se odebere vzorek nejméně 20 ml směsné tekutiny z každé skupiny kontrolních kultur a zkouší se na dvou druzích buněčných kultur opičích ledvin, jak je popsáno výše.

Na konci doby pozorování původních kontrolních buněčných kultur se odeberou obdobné vzorky směsných tekutin a opakují se zkoušky vztahující se k této skupině na dvou druzích buněk opičích ledvin a na kulturách králičích buněk, jak je výše popsáno v odstavci Buněčné kultury.

Jestliže se prokáže přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (virus B), výrobní buněčná kultura se nepoužije a provedou se výše popsaná opatření týkající se výroby vakcíny.

Tekutiny odebrané z kontrolních buněčných kultur v době sklizně viru a na konci doby pozorování se před zkouškou na cizí agens mohou smísit. Vzorek 2 % směsné tekutiny se zkouší v každém specifikovaném systému buněčných kultur.

Jednotlivé sklizně.

Zkoušky neutralizovaných jednotlivých sklizní na buněčných kulturách opičích ledvin. Vzorek nejméně o velikosti 10 ml z každé jednotlivé sklizně se neutralizuje typově specifickým antisérem proti poliomyelitidě připraveným z jiných zvířat, než jsou opice. Při přípravě antiséra pro tento účel se imunizační antigeny připraví v jiných buňkách než opičích.

Polovina neutralizované suspenze (odpovídající nejméně 5 ml jednotlivé sklizně) se zkouší na kulturách buněk opičích ledvin připravených z téhož druhu, ale ne ze stejného zvířete, jaký se použil pro výrobu vakcíny. Druhá polovina neutralizované suspenze se zkouší, je-li třeba na buněčných kulturách opičích ledvin jiného druhu tak, že se provedou zkoušky neutralizované suspenze na buněčných kulturách z nejméně jednoho druhu, o němž je známo, že je citlivý na SV40.

Neutralizované suspenze se inokulují do lahví s těmito buněčnými kulturami takovým způsobem, aby ředění suspenze v růstovém médiu nepřesáhlo poměr 1 : 4. Plocha vrstvy buněk je nejméně 3 cm^2 na mililitr neutralizované suspenze. Nejméně jedna láhev každého typu buněčné kultury zůstane neinokulovaná a slouží jako kontrola a je udržována růstovým médiem obsahujícím stejnou koncentraci specifického antiséra použitého k neutralizaci.

Pro růst buněk se může použít zvířecí sérum, pokud toto sérum neobsahuje protilátky proti SV40. Udržovací médium, používané po inokulaci zkoušeného materiálu, neobsahuje žádné sérum kromě antiséra neutralizujícího poliovirus, s výjimkou dále popsanou.

Kultury se inkubují při teplotě 35 °C až 37 °C a pozorují se po celou dobu nejméně 4 týdnů. Během doby pozorování a po nejméně 2 týdnech inkubace se založí nejméně jedna subkultura z tekutiny z každé kultury na témže systému buněčné kultury. Subkultury se také pozorují nejméně

2 týdny. Sérum se může přidat k původním kulturám v době založení subkultury, pokud neobsahuje protilátky proti SV40.

Na dalším vzorku z neutralizovaných jednotlivých sklizní se provedou další zkoušky na cizí viry inokulací 10 ml na kultury lidských buněk citlivých na virus spalniček.

Pro detekci viru SV40 a ostatních virů v buňkách mohou být užitečné techniky využívající fluorescenčních protilátek.

Tyto zkoušky lze hodnotit, jestliže nejvýše 20 % nádob s kulturami bylo vyřazeno pro náhodné nespecifické důvody do konce vlastní zkušební doby.

Když se objeví cytopatické změny v některé z kultur, příčiny těchto změn se vyšetří. Jestliže se prokáže, že cytopatické změny způsobil nezneutralizovaný poliovirus, zkouška se opakuje.

Projeví-li se známky přítomnosti SV40 nebo jiného cizího agens v jednotlivé sklizni, tato sklizeň se vyřadí.

Monovalentní spojená sklizeň

Monovalentní spojená sklizeň se připraví smícháním počtu vyhovujících jednotlivých sklizní téhož typu viru. Monovalentní spojené sklizně z kontinuálních buněčných linií se mohou purifikovat. Každá monovalentní spojená sklizeň se filtruje filtrem zadržujícím bakterie.

Pouze monovalentní spojená sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu konečné várky vakcíny.

Zkouška totožnosti. Každá monovalentní spojená sklizeň se za použití specifických protilátek prokáže jako poliovirus daného typu.

Koncentrace viru. Koncentrace viru se stanoví dále popsanou metodou a slouží jako základ pro výpočet ředění přípravku v konečné várce, pro množství viru použitého ve zkoušce neurovirulence a ke sledování pravidelnosti výroby.

Neurovirulence *(2.6.19)*. Každá monovalentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce neurovirulence pro vakcínu proti poliomyelitidě (perorální). Je-li tato zkouška prováděna pouze výrobcem, poskytnou se zkušební skla také oprávněné autoritě k hodnocení.

Genetické markery. Poměr replikačních kapacit viru v monovalentní spojené sklizni se získá při teplotě v rozmezí mezi 36 °C a 40 °C ve srovnání s inokulem nebo referenčním přípravkem pro markerové zkoušky a s vhodnými rct/40- a rct/40+ kmeny polioviru téhož typu. Inkubační teploty užívané v této zkoušce se řídí v rozmezí ± 0,1 °C. Monovalentní spojená sklizeň vyhovuje této zkoušce, jestliže titr viru ze sklizně a vhodného referenčního materiálu je při 36 °C nejméně o 5,0 log vyšší než titr stanovený při 40 °C. Je-li růst při 40 °C tak nízký, že validní srovnání nelze provést, použije se teplota v rozmezí 39,0 °C až 39,5 °C. Při této teplotě je snížení titru referenčního materiálu v rozmezí od 3,0 log do 5,0 log proti hodnotě při 36 °C. Přijatelná minimální redukce se pro každý kmen viru stanoví při dané teplotě. Jestliže titry získané pro jeden nebo více referenčních virů nejsou ve shodě s očekávanými hodnotami, zkouška se opakuje.

Primární opičí buňky. *Následující speciální požadavky platí pro monovalentní spojené sklizně odvozené z primárních opičích buněk.*

Zkoušky na králících. Vzorek monovalentní spojené sklizně se zkouší na přítomnost cerkopitecidního herpesviru 1 (B virus) a ostatní viry vstříknutím nejméně 100 ml nejméně deseti zdravým králíkům hmotnosti 1,5 kg až 2,5 kg. Každý králík dostane nejméně 10 ml a nejvýše 20 ml, přičemž 1 ml je podán intradermálně na několik míst a zbytek subkutánně. Králíci se pozorují nejméně 3 týdny, sleduje se úhyn a známky onemocnění.

Všichni králíci, kteří uhynuli po prvních 24 h zkoušky a vykazují známky onemocnění, se pitvají a vyjme se jim mozek a orgány k podrobnému vyšetření pro zjištění příčiny úhynu.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže nejvýše 20 % inokulovaných králíků vykazuje známky interkurentní infekce během doby pozorování. Monovalentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce, jestliže žádný z králíků nemá známky infekce virem B nebo ostatními cizími agens nebo léze jakéhokoliv druhu, jež lze přisoudit suspenzi várky.

Při průkazu přítomnosti viru B se provedou opatření týkající se výroby vakcíny uvedená výše v odstavci Buněčné kultury.

Zkouška na morčatech. Nejméně pěti morčatům, každému o hmotnosti 350 g až 450 g, se podá 0,1 ml monovalentní spojené sklizně intracerebrálně a 0,5 ml intraperitoneálně. Po 6 týdnů se každý pracovní den měří rektálně teplota každému zvířeti. Na konci doby pozorování se provede pitva každého zvířete.

Kromě toho se nejméně pěti morčatům intraperitoneálně podá 0,5 ml a 2 až 3 týdny se pozorují, jak je popsáno výše. Na konci doby pozorování se provede pasáž krve a suspenze jaterní nebo slezinné tkáně nejméně dalším pěti morčatům. Těmto morčatům se po dobu 2 až 3 týdnů měří rektálně teplota. Jestliže dojde po prvním dni k úhynu nebo jsou zvířata utracena pro příznaky onemocnění, provede se pitva. Pitva se provede také v případě, že vykazují po tři za sebou následující dny teplotu vyšší než 39 °C; provede se histologické vyšetření k detekci viru Marburg; navíc se intraperitoneálně podá suspenze jaterní nebo slezinné tkáně nebo krve nejméně třem dalším morčatům. Jestliže se zjistí jakékoliv příznaky infekce virem Marburg, provede se konfirmační sérologický test z krve postižených zvířat. Monovalentní spojená sklizeň vyhovuje zkoušce, jestliže nejméně 80 % morčat přežívá do konce doby pozorování v dobrém zdravotním stavu a žádné zvíře nemá příznaky infekce virem Marburg.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více vyhovujících monovalentních spojených sklizní a může obsahovat více než jeden typ viru. Mohou se přidat vhodné ochucující látky a stabilizátory.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu šarže.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu *(2.6.1);* na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Pouze šarže, která vyhovuje následujícímu požadavku na teplotní stabilitu a vyhovuje všem požadavkům uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkouška na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití.

Teplotní stabilita. Vzorky z šarže se 48 h uchovávají při 37 °C. Stanoví se celková koncentrace viru, jak je popsáno v odstavci Stanovení účinnosti, současně ve vzorkách vystavených vyšší teplotě a ve vzorkách nezahřáté vakcíny. Stanovený rozdíl mezi celkovou virovou koncentrací zahřáté a nezahřáté vakcíny není vyšší než 0,5 $\log_{10}$ infekční virové jednotky ($CCID_{50}$) na jednu lidskou dávku.

Zkouška totožnosti

Použitím specifických protilátek se prokáže, že vakcína obsahuje poliovirus každého typu uvedeného v označení na obalu.

Zkouška na čistotu

Bakterie a houby. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu *(2.6.1).*

Stanovení účinnosti

Titrace infekčního viru se provádí nejméně trojmo za použití metody dále popsané. K validaci každého stanovení se používá vhodný referenční virus. Jestliže vakcína obsahuje více než jeden typ polioviru, titruje se každý typ odděleně za neutralizace ostatních přítomných typů vhodnými specifickými antiséry (nebo přednostně monoklonálními protilátkami).

Pro trivalentní vakcínu jsou stanoveny tyto dolní titry virů: nejméně $1 \cdot 10^{6,0}$ infekčních virových jednotek ($CCID_{50}$) v jednotlivé lidské dávce pro typ 1; nejméně $1 \cdot 10^{5,0}$ infekčních virových jednotek ($CCID_{50}$) pro typ 2; nejméně $1 \cdot 10^{5,5}$ infekčních virových jednotek ($CCID_{50}$) pro typ 3.

Pro monovalentní a divalentní vakcínu rozhodne o výši minimálního titru oprávněná autorita.

Metoda. Skupiny osmi až dvanácti jamek s plochým dnem na mikrotitrační destičce se inokulují 0,1 ml každého vybraného ředění viru a následně se přidá vhodná suspenze buněk linie Hep-2 (Cincinnati). Destičky se inkubují ve vhodné teplotě. Kultury se vyšetřují v 7. až 9. dnu. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže interval spolehlivosti ($P = 0,95$) logaritmu virové koncentrace je nejvýše ±0,3.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení na obalu se uvede:
- typy polioviru obsažené ve vakcíně,
- minimální množství viru každého typu obsažené v jedné lidské dávce,
- buněčný substrát použitý pro výrobu vakcíny,
- že se vakcína nevstřikuje.

Vaccinum pseudopestis aviariae inactivatum

Inaktivovaná vakcína proti pseudomoru ptáků

Synonymum. Inaktivovaná vakcína proti Newcastleské chorobě

Je to emulze nebo suspenze vhodného kmene viru pseudomoru ptáků inaktivovaného takovým způsobem, který zachová jeho imunogenní účinnost. Vakcína může obsahovat olejové nebo jiné vhodné adjuvans.

Výroba

Viz článek *Vaccinum ad usum veterinarium.*

Virus se pomnoží v kuřecích embryích pocházejících ze zdravých chovů nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*).

Zkouška na pomnožení reziduálních živých virů se provádí při sklizni meziproduktu těsně před přidáním adjuvans, aby potvrdila inaktivaci viru. Zkouška se provádí na kuřecích embryích nebo ve vhodné buněčné kultuře a použité množství inaktivovaného viru odpovídá nejméně deseti dávkám vakcíny. Nezjistí se žádný živý virus.

Výběr složení vakcíny

Vakcína je prokazatelně uspokojivá z hlediska bezpečnosti a imunogenity pro všechny druhy a kategorie ptáků, pro které je určena. K průkazu účinnosti (*5.2.7*) se může použít následující zkouška.

Imunogenita. Pro domácí drůbež je k prokázání imunogenity vhodná zkouška s virulentní čelenží (zkouška B) popsaná v odstavci Stanovení účinnosti.

Zkouška totožnosti

Podána vnímavým zvířatům podporuje vakcína tvorbu protilátek proti viru pseudomoru ptáků (ptačí paramyxovirus typ I).

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Pokud je vakcína určena pro domácí drůbež, podá se deseti kuřatům z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Pokud vakcína není určena pro domácí drůbež, podává se deseti zdravým ptákům toho druhu, pro který je určena. Podají se dvě dávky vakcíny jedním z doporučených způsobů podání každému z deseti ptáků starých 14 dní až 28 dní. Doba pozorování je 21 dnů. Neobjeví se žádné abnormální místní ani systémové reakce.

Inaktivace. Deseti kuřecím embryím z chovu prostého specifikovaných patogenů (SPF vejce) (*5.2.2*) a starých 9 dní až 11 dní se do alantoidní dutiny vstříkne po dvou pětinách dávky a nechají se inkubovat. Pozorují se 6 dnů, pak se odděleně shromáždí alantoidní tekutina z vajec obsahujících živá embrya a z vajec obsahujících mrtvá embrya, z nichž se vyřadí ta, která uhynula do 24 h po injekci. Embrya, která uhynula do 24 h po injekci, se zkouší na přítomnost viru pseudomoru ptáků. Vakcína nevyhovuje, pokud je tento virus zjištěn.

Do alantoidní dutiny každého z deseti 9 dnů až 11 dnů starých SPF vajec se vstříkne po 0,2 ml spojené alantoidní tekutiny z vajec se živými embryi a do každého z dalších deseti SPF vajec 0,2 ml spojené tekutiny z vajec s uhynulými embryi, inkubuje se 5 až 6 dnů. Alantoidní tekutina z každého vejce se zkouší na přítomnost hemaglutininů za použití kuřecích erytrocytů.

Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejsou přítomny známky hemaglutinační aktivity a jestliže neuhyne více než 20 % embryí v jedné ze skupin. Pokud v jedné ze skupin uhyne více než 20 % embryí, opakuje se zkouška v této skupině. Nezjistí se hemaglutinační aktivita a nejvýše 20 % embryí ve skupině smí uhynout.

K vyloučení bakteriální infekce se mohou v této zkoušce použít antibiotika.

Cizí agens. Každému z deseti kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů a 14 až 28 dnů starých se jedním z doporučených způsobů podají dvě dávky. Po třech týdnech se každému kuřeti doporučeným způsobem podá jedna dávka. Po dvou týdnech se získají vzorky sér od každého kuřete a provedou se zkoušky na přítomnost protilátek proti sledovaným agens metodami předepsanými pro chovy prosté specifikovaných patogenů, které se používají pro výrobu a kontrolu kvality vakcín (*5.2.2*): virus ptačí encefalomyelitidy, virus ptačí infekční bronchitidy, virus ptačí leukózy, hemaglutinační ptačí adenovirus, virus infekční burzitidy, virus infekční laryngotracheitidy, virus chřipky A, virus Markovy choroby. Vakcína nevyvolá tvorbu protilátek proti těmto virům.

Sterilita. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

A. Každému z nejméně deseti kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů a 21 až 28 dnů starých se vstříkne intramuskulárně objem vakcíny odpovídající 1/50 dávky. Za 17 až 21 dnů se odeberou vzorky séra od každého vakcinovaného kuřete a od každého z deseti kontrolních kuřat stejného věku a stejného původu. Hladina protilátek v jednotlivých sérech se měří dále popsanou hemaglutinačně-inhibiční zkouškou (HI) nebo rovnocennou metodou se stejným počtem hemaglutinačních jednotek a množstvím erytrocytů a s pozitivním kontrolním sérem kalibrovaným podle mezinárodního referenčního přípravku séra proti pseudomoru ptáků. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže průměrný HI titr vakcinované skupiny je stejný nebo větší než 4 $\log_2$ a titr u nevakcinované skupiny je 2 log nebo méně. Jestliže HI titry nejsou uspokojivé, provede se zkouška B.

Hemaglutinačně-inhibiční zkouška. Zkoušená séra se 30 min inaktivují zahřátím na 56 °C. Do první řady jamek mikrotitrační destičky se odpipetuje po 0,05 ml inaktivovaných sér a do ostatních jamek se odpipetuje 0,50 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) o pH 7,2 až 7,4. Připraví se dvojnásobné ředění séra po celé destičce. Do každé jamky se přidá 0,05 ml suspenze obsahující 4 hemaglutinační jednotky inaktivovaného viru pseudomoru ptáků. Destičky se 1 h inkubují při 4 °C, přidá se 0,05 ml 1% suspenze červených krvinek získaných ze 3- až 4týdenních kuřat vnímavých k pseudomoru ptáků. Destičky se 1 h inkubují při 4 °C. Ve zkoušce se použijí jak pozitivní, tak negativní séra. Pozitivní kontrolní sérum má titr 300 m.j. až 400 m.j. stanovených kalibrací na mezinárodní referenční přípravek a HI titr 5 $\log_2$ až 6 $\log_2$ stanovený v použitém zkušebním systému.

B. Použijí se kuřata z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) a stará 21 až 28 dnů. Pro vakcinaci se použijí nejméně tři skupiny, v každé nejméně dvacet kuřat; deset kuřat se ponechá jako kontrolní skupina. Vybere se takový počet různých objemů vakcíny, jaký je počet skupin: například objemy odpovídající 1/25, 1/50, 1/100 dávky. Každé skupině se podá odlišný objem. Každému kuřeti se intramuskulárně podá objem zvolený pro danou skupinu. Za 17 až 21 dnů se všem kuřatům podá intramuskulární injekce o obsahu 6 $\log_{10}$ embryonální LD_{50} viru pseudomoru ptáků - kmene Herts (Weybridge 33/56). (Embryonální LD_{50} aplikovaného kmene se stanoví sledováním embryí po dobu 6 dnů.) Kuřata se sledují 21 dnů. Z počtu kuřat, které přežijí 21 dní v každé vakcinační skupině bez klinických známek onemocnění Newcastleskou chorobou, se vypočítá PD_{50} standardními statistickými metodami. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže nejmenší dávka uvedená na označení vakcíny odpovídá nejméně 50 PD_{50} a spodní hranice spolehlivosti je nejméně 35 PD_{50} na dávku. Je-li tento limit méně než 35 PD_{50} na dávku, zkouška se opakuje. Vakcína v opakované zkoušce obsahuje nejméně 50 PD_{50}. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, pokud všechna kuřata v kontrolní skupině uhynou během 6 dnů po čelenži.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede:

- druh a třída ptáků, pro které je vakcína určena,
- kmen viru, který byl použit pro výrobu.

Vaccinum pseudopestis aviariae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti pseudomoru ptáků lyofilizovaná

Synonymum. Živá vakcína proti Newcastleské chorobě

Je to přípravek lentogenního kmene viru pseudomoru.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Virus se pomnoží v alantoidní dutině kuřecích embryí z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Jsou-li buněčné kultury ptačího původu, jsou získány z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Virové suspenze se shromáždí, smíchají s vhodnou stabilizující tekutinou a lyofilizují.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu vakcíny se může použít pouze kmen, který je prokazatelně imunogenní a jehož index neurovirulence není vyšší než 0,5. Při průkazu bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Index neurovirulence. Vzorek inokula, je-li třeba rekonstituovaný, se vstříkne do alantoidní dutiny kuřecích embryí 9 až 11 dní starých pocházejících z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*). Vejce se inkubuje 2 dny, potom se sklidí alantoidní tekutiny. Každému z nejméně deseti jednodenních (to je více než 24 h, ale méně než 40 h po vylíhnutí) vnímavých kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů se intracerebrálně vstříkne 0,05 ml alantoidní tekutiny obsahující množství viru odpovídající nejméně 10^8 EID_{50}. Kuřata se pozorují 8 dnů a každý den se zaznamenává počet zdravých, počet vykazujících příznaky onemocnění a počet uhynulých. Všechny tři soubory se sečtou. Celkový součet zdravých se násobí nulou, celkový počet vykazujících příznaky onemocnění se násobí 1 a celkový počet úhynů se násobí 2. Index neurovirulence se získá, když se součet tří předchozích součinů dělí součtem počtu zdravých, nemocných a uhynulých zvířat.

Imunogenita. K prokázání imunogenity je vhodná zkouška, která je popsána v odstavci Stanovení účinnosti.

Zkoušení šarže

Pokud byly zkouška na viry ptačí leukózy a zkoušky na cizí viry na buněčných kulturách a kuřecích embryích provedeny na reprezentativní šarži vakcíny s vyhovujícími výsledky, mohou být tyto zkoušky při rutinních kontrolách jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypuštěny, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno s vyhovujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může být tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených ze stejného inokula vypuštěna, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Rekonstituovaná vakcína smísená s monospecifickým antisérem již nevyvolá hemaglutinaci vhodné koncentrace kuřecích erytrocytů nebo již neinfikuje vnímavá kuřecí embrya, ve stáří 9 až 11 dnů, nebo vnímavé buněčné kultury, do nichž je inokulována.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použije se nejméně deset kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) a nejnižšího stáří, které je pro vakcinaci uvedeno v označení. Každému kuřeti se nakape do oka deset dávek vakcíny rekonstituované tak, aby se získala koncentrace vhodná pro zkoušku. Kuřata se pozorují 21 dnů. U vakcín určených k vakcinaci kuřat starých dva týdny nebo více se použijí kuřata inokulovaná ve zkoušce na cizí antigeny. Jestliže v období pozorování uhyne více než dvě kuřata z příčin, které nelze přisoudit vakcíně, zkouška se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné z kuřat nemá vážné klinické příznaky, zvláště příznaky dýchací, a žádné z kuřat neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na leukózní viry.

Cizí viry při použití buněčných kultur (*2.6.5*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry při použití buněčných kultur.

Cizí viry při použití kuřecích embryí (*2.6.3*). Neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry při použití kuřecích embryí.

Cizí antigeny (*2.6.6*). Vakcína vyhovuje zkoušce na cizí antigeny při použití kuřat.

Bakterie a houby. Provede se kvantitativní zkouška na bakterie a houby. Vakcína neobsahuje více než jeden saprofytický mikroorganismus v dávce a je prosta patogenních mikroorganismů. Vakcíny určené pro parenterální podání a tekutiny s nimi dodávané vyhovují zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Rekonstituovaná vakcína se titruje v buněčných kulturách nebo inokulací do alantoidní dutiny kuřecích embryí starých 9 až 11 dnů. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použijí se vnímavá kuřata z jednoho chovu prostého specifikovaných patogenů a nejnižšího stáří, které je pro vakcinaci uvedeno v označení. Každému z nejméně dvaceti kuřat pro každý z udávaných způsobů podání se podá takový objem rekonstituované vakcíny, který obsahuje množství viru, jež odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení. Pro kontrolu se použije deset kuřat. Po 14 až 21 dnech se každé kuře čelenžuje intramuskulárně 10^5 LD_{50} virulentního kmene viru pseudomoru ptáků. Zvířata se pozorují 10 dnů. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže na konci doby pozorování nejméně 90 % vakcinovaných kuřat přežívá a nejeví příznaky onemocnění a všechna kontrolní kuřata uhynula do 6 dnů po inokulaci virulentním čelenžním kmenem.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.
V označení na obalu se uvede stáří zvířat, jež se mají vakcinovat.

Vaccinum rabiei ex cellulis ad usum humanum

Humánní vakcína proti vzteklině připravená v buněčných kulturách

Je to lyofilizovaný přípravek vhodného stabilního kmene viru vztekliny pomnoženého v buněčných kulturách a inaktivovaného validovanou metodou.

Vakcína se rozpustí bezprostředně před použitím podle návodu, vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

Vakcína vyhovuje požadavkům článku *Vaccina ad usum humanum*.

Výroba

Výrobní metoda prokazatelně poskytuje stejnorodou vakcínu, která vyhovuje požadavkům na imunogenitu, neškodnost a stabilitu. Jestliže není stanoveno oprávněnou autoritou jinak, virus v konečné vakcíně neprojde více pasážemi od matečného inokula než virus vakcíny, která vyhověla v klinické zkoušce na neškodnost a účinnost: dokonce podle autorizované výjimky počet pasáží pro klinickou studii nepřesáhne pět.

Výrobní metoda se validuje, aby se dokázalo, že přípravek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost pro imunní séra a vakcíny pro humánní použití (*2.6.9*).

Substrát pro pomnožení viru

Virus se pomnoží v buňkách lidské diploidní linie *(5.2.3)*, v kontinuální linii schválené oprávněnou autoritou nebo v buňkách kuřecích embryí odvozených z chovu prostého specifikovaných patogenů *(5.2.2)*.

Inokula

Použitý kmen viru je identifikován záznamy, včetně informace o původu kmene a následné manipulaci s ním.

Pracovní inokulum se připraví nejvýše pěti pasážemi od matečného inokula. Jen takové pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím zkouškám, se může použít pro pomnožování viru.

Totožnost. Každé pracovní inokulum se specifickými protilátkami prokáže jako rabický virus.

Virová koncentrace. Aby se zajistila stejnorodost výroby, stanoví se virová koncentrace v každém pracovním inokulu metodou buněčné kultury za použití imunofluorescence.

Cizí agens *(2.6.16).* Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na virová inokula. Je-li virus pasážován na myších mozcích, provedou se specifické zkoušky na myší viry.

Pomnožování a sklizeň viru

Všechny činnosti s buněčnou bankou a následnými buněčnými kulturami probíhají za aseptických podmínek v prostoru, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do médií se může použít schválené sérum živočišného, nikoli humánního původu, ale konečné udržovací médium pro buněčný růst při pomnožování viru neobsahuje živočišné sérum: média mohou obsahovat lidský albumin vyhovující článku *Albumini humani solutio*. Sérum a trypsin použité pro přípravu buněčné suspenze a médií prokazatelně neobsahují infekční cizí agens: trypsin vyhovuje článku *Trypsinum*. Média pro buněčnou kulturu mohou obsahovat indikátor pH, jako je fenolová červeň, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Nejméně 500 ml buněčných kultur použitých pro výrobu vakcíny se ponechá neinfikovaných (kontrolní buňky). Virová suspenze se sklízí jednou nebo vícekrát během inkubace. Více sklizní z téže produkční buněčné kultury se může spojit a považovat

za jednu sklizeň. Jen taková jednotlivá sklizeň, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít pro přípravu inaktivované virové sklizně.

Totožnost. Jednotlivá sklizeň obsahuje virus, který se specifickými protilátkami prokáže jako rabický virus.

Virová koncentrace. Infekční virus se stanoví na buněčných kulturách: titrem se sleduje stejnoměrnost výroby.

Kontrolní buňky. Kontrolní buňky z produkční buněčné kultury, z níž se odvozují jednotlivé sklizně, vyhovují zkoušce totožnosti a požadavkům na cizí agens *(2.6.16)*.

Purifikace a inaktivace

Virová sklizeň se může koncentrovat a případně též purifikovat vhodnými metodami: virová sklizeň se inaktivuje validovanou metodou v pevně definovaném stadiu výroby, které může být před, během nebo po koncentraci nebo purifikaci. Metoda je prokazatelně schopna inaktivovat rabický virus bez zničení imunogenní aktivity. Při použití betapropiolaktonu nepřesahuje jeho koncentrace v žádné chvíli 1 : 3500.

Pro přípravu konečné várky vakcíny se použije jen taková inaktivovaná virová suspenze, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Inaktivace. Provede se pomnožovací zkouška na zbytkový infekční rabický virus buďto ihned po inaktivaci, nebo se použije vzorek zmražený bezprostředně po inaktivaci a uchovávaný při -70 °C. Naočkuje se takové množství inaktivované virové suspenze, které odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny na buněčnou kulturu téhož typu, jaký byl použit pro výrobu vakcíny. Subkultury po 7 dnech a po 14 dnech se zkoušejí na přítomnost rabického viru imunofluorescenční zkouškou. Rabický virus se nezjistí.

Zbytková DNK hostitelských buněk. Jestliže se pro pomnožování viru použije kontinuální buněčná linie, stanoví se obsah zbytkové DNK hostitelských buněk vhodnou metodou, jak je uvedeno v článku *Producta ab ADN recombinante*, a není větší než 100 pg v jedné lidské dávce.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné nebo více inaktivovaných virových suspenzí. Může se přidat schválený stabilizátor k uchování účinnosti přípravku při lyofilizaci a po ní.

K přípravě šarže se může použít jen taková konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Obsah glykoproteinu. Vhodnou imunochemickou metodou *(2.7.1)* se stanoví obsah glykoproteinu, např. jednoduchou radiální imunodifuzí, metodou ELISA nebo Zkouškou vazby protilátek. Obsah je v rozmezí schváleném pro jednotlivý přípravek.

Sterilita *(2.6.1)*. Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu, při níž se na každou živnou půdu použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních obalů a lyofilizuje až do obsahu vlhkosti, který zaručuje optimální stabilitu přípravku. Obaly se uzavírají tak, aby se vyloučila kontaminace a pronikání vlhkosti.

K použití se může uvolnit jen taková šarže, která vyhovuje požadavkům uvedeným dále v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkouška na čistotu a Stanovení účinnosti. Za předpokladu, že zkouška na inaktivaci byla provedena v inaktivované virové suspenzi s vyhovujícím výsledkem a zkouška na bovinní sérumalbumin v konečné várce s vyhovujícím výsledkem, mohou být tyto zkoušky vynechány u šarže.

Zkouška totožnosti

Přítomnost antigenu rabického viru se prokáže vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*) za použití protilátek, nejlépe mnonoklonálních. Vedle toho také stanovení účinnosti slouží jako zkouška totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Inaktivace. Množství odpovídající nejméně dvaceti pěti lidským dávkám vakcíny se naočkuje na buněčnou kulturu téhož typu, který byl použit pro přípravu vakcíny. Subkultury po 7 dnech a po 14 dnech se zkoušejí na přítomnost rabického viru imunofluorescenční zkouškou. Rabický virus se nezjistí.

Bovinní sérumalbumin. Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce. Obsah se stanoví vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 25 m.j. v jedné lidské dávce.

Pyrogenní látky *(2.6.8)*. Vakcína vyhovuje ve zkoušce na pyrogenní látky, při níž se, pokud není stanoveno jinak, vstříkne každému králíkovi jedna lidská dávka desetkrát zředěná.

Voda, semimikrostanovení *(2.5.12)*. Nejvýše 3,0 %.

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší proti účinku letální dávky rabického viru intracerebrálně podané s množstvím referenčního přípravku nezbytným k vytvoření stejné ochrany. Pro toto porovnání je zapotřebí referenční vakcína kalibrovaná v mezinárodních jednotkách a vhodný rabický virus používaný jako čelenžní přípravek.

Mezinárodní jednotka je účinnost obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Dále uvedená zkouška používá rovnoběžný model s nejméně třemi body pro zkoušený přípravek i pro referenční přípravek. Pouze pracovník se zkušenostmi s touto metodou podání je oprávněn provádět zjednodušenou zkoušku s jedním ředěním zkoušeného přípravku. Taková zkouška dovoluje pracovníkovi určit, že vakcína má účinnost signifikantně vyšší, než je požadované minimum, ale nedává plnou informaci o validitě každého jednotlivého stanovení účinnosti. Užití jednoho ředění dovoluje značnou redukci počtu zvířat předepsaných pro zkoušku a je zvažováno každou laboratoří ve vztahu k ustanovením Evropské konvence pro ochranu obratlovců používaných pro vědecké a jiné experimentální účely.

Výběr a rozložení zkušebních zvířat. Používají se zdravé samičky myší staré asi 4 týdny hmotnosti 11 g až 15 g a pocházející z jednoho chovu. Myši se rozdělí do šesti skupin o tolika zvířatech, aby byly splněny požadavky na validitu zkoušky. Pro titraci čelenžní suspenze se rozdělí do čtyř skupin po pěti.

Příprava čelenžní suspenze. Myším se intracerebrálně vstříkne kmen CVS rabického viru, a když myši vykazují známky onemocnění, ale před jejich úhynem, se usmrtí, vyjmou se mozky a připraví se homogenát mozkové tkáně ve vhodném ředidle. Větší částice se oddělí odstředěním a supernatant se použije jako čelenžní suspenze. Suspenze se rozplní v malých objemech do ampulí, které se zataví a uchovávají při teplotě nižší než -60 °C. Jedna ampule se suspenzí se rozmrazí, vhodným ředidlem se připraví sériová ředění. Každé ředění se intracerebrálně vstříkne skupině pěti myší po 0,03 ml příslušného ředění. Myši se pozorují po dobu 14 dnů. Hodnota LD_{50} neředěné

suspenze se vypočítá z počtu zvířat v každé skupině, která vykazují známky onemocnění nebo uhynula mezi pátým a čtrnáctým dnem.

Stanovení účinnosti zkoušené vakcíny. Připraví se tři pětinásobná sériová ředění zkoušeného přípravku a tři pětinásobná sériová ředění referenčního přípravku. Připraví se ředění tak, že u nejkoncentrovanějšího ředění lze očekávat, že ochrání více než 50 % zvířat, jimž bylo podáno, a u nejméně koncentrovaných ředění lze očekávat ochranu nižší než 50 % u zvířat, kterým bylo toto ředění podáno. Každé ze šesti ředění se podá jedné ze šesti šestnáctičlenných skupin zvířat a každé myši se intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml toho ředění, které bylo přiděleno skupině. Po sedmi dnech se připraví tři identická ředění zkoušeného přípravku a referenčního přípravku a injekce se opakuje. Sedm dní po druhé injekci se připraví na základě předchozí titrace taková suspenze čelenžního viru, aby 0,03 ml obsahovalo 50 LD_{50}. Intracerebrálně se každé vakcinované myši vstříkne 0,03 ml této suspenze. Připraví se tři vhodná sériová ředění čelenžní suspenze a suspenze a ředění se přičlení ke čtyřem skupinám po deseti zvířatech. Čelenžní suspenze a tři ředění se intracerebrálně vstříknou čtyřem skupinám myší po 0,03 ml. Zvířata všech skupin se pozorují 14 dní a zaznamenávají se počty zvířat vykazujících známky onemocnění vzteklinou nebo uhynulých v období od pátého do čtrnáctého dne po čelenži.

Zkoušku lze hodnotit, jestliže 50% ochranná dávka referenčního přípravku i zkoušeného přípravku leží mezi nejvyšší a nejnižší dávkou podanou myši; jestliže titrace čelenžní suspenze prokáže, že 0,03 ml čelenžní suspenze obsahuje nejméně 10 LD_{50}; jestliže statistická analýza vykazuje signifikantní sklon a nesignifikantní odchylku linearity nebo rovnoběžnosti v závislosti dávka - odpověď; jestliže interval spolehlivosti ($P = 0{,}95$) je v rozmezí 25 % až 400 % stanovené účinnosti.

Vakcína vyhovuje, jestliže stanovená účinnost je nejméně 2,5 m.j. v lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanun*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede biologický původ buněk použitých k přípravě vakcíny.

Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium

Inaktivovaná vakcína proti vzteklině pro veterinární použití

Je to tekutý nebo lyofilizovaný přípravek z fixního viru vztekliny inaktivovaný vhodným způsobem. Virus se pomnoží ve vhodné buněčné kultuře nebo v jiných vhodných substrátech a může se purifikovat a koncentrovat. Vakcína může obsahovat adjuvans a vhodnou protimikrobní konzervační látku.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Vakcíny z tkáňových kultur se připravují pomnožením viru v primárních buněčných kulturách ze zdravých zvířat nebo ve vhodných buněčných liniích (*5.2.4*). Virová suspenze se sklízí jedenkrát

nebo vícekrát během 28 dní po naočkování. Vícenásobné sklizně z jedné buněčné kultury se mohou spojit a považovat za jednotlivou sklizeň. Virus vztekliny se inaktivuje vhodnou metodou.

U vakcín z buněčných kultur se na buněčných kulturách stejného druhu, jaké byly použity při výrobě vakcíny, provede zkouška na zbytkový infekční virus vztekliny, aby se potvrdila účinná inaktivace viru vztekliny. Množství inaktivovaného viru pro tuto zkoušku odpovídá nejméně dvaceti pěti dávkám vakcíny. Nezjistí se živý virus.

Účinnost reprezentativní šarže vakcíny se prokazuje přímou čelenží a nepřímou metodou prokazující tvorbu neutralizačních protilátek na každém druhu zvířat, pro který je vakcína určena.

Následující požadavky platí pro tekuté přípravky a pro lyofilizované přípravky rekonstituované podle údajů v označení.

Zkouška totožnosti

Vakcína po podání zvířatům podporuje tvorbu specifických neutralizačních protilátek.

Zkouška na čistotu

Bezpečnost. Jestliže je vakcína určena pro více než jeden druh zvířat, včetně psa, provede se zkouška na psech. Jinak se použije jeden z druhů zvířat, pro který je vakcína určena. Dvěma vnímavým zvířatům se vstříkne způsobem uvedeným v označení dvojnásobek nejmenší dávky vakcíny. Zvířata se pozorují 21 dní. Nevzniknou významné místní nebo systémové reakce.

Inaktivace. Nejméně deseti myším hmotnosti 11 g až 15 g se intracerebrálně vstříkne po 0,03 ml ředění, které odpovídá nejméně pětinásobku udané nejmenší dávky. Pokud vakcína obsahuje protimikrobní konzervační látku nebo adjuvans, rozředí se před aplikací nejvýše desetkrát. V tomto případě, a nebo když vakcinační kmen je patogenní jen pro sající myšky, provede se zkouška na jednodenních až čtyřdenních myškách. Zvířata se pozorují 21 dní. Jestliže více než dvě zvířata uhynou v průběhu prvních 48 h, zkouška se opakuje. Zvířata nemají od 3. do 21. dne po podání žádné příznaky vztekliny nebo jiné anomálie, které by bylo možno přičítat vakcíně.

Místo této zkoušky je možno použít u tkáňových vakcín, které neobsahují žádné adjuvans, vhodnější pomnožovací zkoušky na přítomnost zbytkového infekčního viru, pro kterou se použije stejný druh tkáňových kultur, jaký byl použit pro výrobu vakcíny.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví porovnáním dávky potřebné k ochraně myší před klinickými účinky dále definované dávky vzteklinového viru intracerebrálně podaného v porovnáním s množstvím referenčního přípravku *inaktivované vakcíny proti vzteklině pro veterinární použití BRP* kalibrované v mezinárodních jednotkách nezbytným k dosažení stejné ochrany.

Výběr a rozdělení pokusných zvířat. Ke zkoušce se používají zdravé myši ve stáří asi 4 týdnů a hmotnosti 11 g až 15 g z jednoho chovu. Myši se rozdělí do nejméně deseti skupin po nejméně deseti zvířatech. Všechny myši jsou stejného pohlaví.

Příprava suspenze k čelenži. Jedné skupině myší se intracerebrálně vstříkne kmen CVS viru vztekliny. Při vzniku příznaků vztekliny ještě před jejich uhynutím se myši usmrtí, odeberou se mozky a z mozkové tkáně se připraví ve vhodném rozpouštědle homogenní suspenze. Po oddělení hrubých částic odstředěním se supernatant použije jako čelenžní suspenze. Suspenze se rozplní v malých objemech do ampulí, které se zataví a uchovávají při teplotě nižší než -60 °C. Jedna

ampule se rozmrazí a ve vhodném rozpouštědle se připraví sériové ředění. Každé ředění se použije pro jednu skupinu deseti myší. Každé myši se intracerebrálně vstříkne 0,03 ml příslušného ředění. Myši se pozorují 14 dní a v každé skupině se zaznamenává počet zvířat, u kterých se mezi 5. až 14. dnem vyvinuly příznaky vztekliny. Potom se vypočte ID_{50} neředěné suspenze.

Postup zkoušky. Připraví se nejméně tři sériová ředění zkoušeného přípravku a tři podobné řady ředění porovnávacího přípravku.

Ředění se vyberou tak, aby ředění s nejvyšší koncentrací vakcíny chránilo nejméně 50 % zvířat, jimž bylo podáno, a ředění s nejnižší koncentrací vakcíny chránilo méně než 50 % zvířat, jimž bylo podáno. Každé ředění se použije u jedné skupiny myší. Každé myši se intraperitoneálně vstříkne 0,5 ml příslušného ředění. Za 14 dní po podání vakcíny se připraví suspenze čelenžního viru tak, aby na podkladě předtitrace obsahovala každá čelenžní dávka 50 ID_{50} v 0,03 ml. Všem vakcinovaným myším se intracerebrálně vstříkne po 0,03 ml čelenžní suspenze. Mimo to se připraví tři další sériová ředění použitého čelenžního viru. Ředění použité k čelenži a připravená tři další ředění se intracerebrálně vstříknou v dávce 0,03 ml na myš dalším čtyřem skupinám po deseti nevakcinovaných myších. Zvířata všech skupin se pozorují 14 dní. V každé skupině mohou do 4 dní po čelenži uhynout nejvýše dvě myši. V každé skupině se zaznamenává počet zvířat, u kterých se v době od 5 do 14 dní po čelenži vyskytly příznaky vztekliny.

Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže:

- 50% ochranná dávka zkoušeného i referenčního přípravku je mezi největší a nejmenší dávkou vakcíny podanou myším,
- kontrolní titrace čelenžní suspenze prokáže, že v dávce 0,03 ml bylo dosaženo nejméně 10 ID_{50}
- interval spolehlivosti (P = 0,95) je v rozmezí 25 % až 400 % stanovené účinnosti,
- statistická analýza ukazuje signifikantní vzestup a žádné signifikantní odchylky od linearity a rovnoběžnosti přímek závislosti odpovědi na dávce.

Vakcína vyhovuje zkoušce, když stanovená účinnost je nejméně 1 m.j. v nejmenší předepsané dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede:

- druh tkáně nebo buněčné kultury, které byly použity pro přípravu vakcíny, a druh původu,
- nejmenší počet mezinárodních jednotek v dávce.

Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem

Živá vakcína proti vzteklině perorální pro lišky

Je to přípravek z imunogenního kmene oslabeného viru vztekliny. Vakcína se vloží do návnady tak, že se mohou asepticky provést dále popsané zkoušky.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Oslabený kmen viru se pomnožuje ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*); v případě, že buněčné kultury jsou savčího původu, jsou prokazatelně prosté viru vztekliny. Virová suspenze se sklízí jedenkrát nebo vícekrát během 14 dnů po naočkování. Vícenásobné sklizně z jedné buněčné kultury se mohou spojit a považovat za jednotlivou sklizeň. Virová suspenze se může smíchat s vhodným stabilizátorem. Vakcína může být tekutá nebo lyofilizovaná. Lyofilizovaná vakcína se před použitím rekonstituuje.

Výběr vakcinačního kmene

Pro výrobu vakcíny se může použít jen takový kmen viru, který je prokazatelně uspokojivý z hlediska imunogenity (viz Stanovení účinnosti) a následujících charakteristik:

- při perorálním podání v doporučené dávce a doporučenou metodou nevzniknou u čtyřiceti lišek v průběhu 180 dnů od podání žádné příznaky onemocnění vzteklinou,
- při perorálním podání desetinásobné doporučené dávky nevzniknou u deseti lišek v průběhu 180 dnů od podání žádné příznaky onemocnění vzteklinou,
- při perorálním podání desetinásobné doporučené dávky nevzniknou u deseti psů v průběhu 180 dnů od podání žádné příznaky onemocnění vzteklinou,
- při perorálním podání desetinásobné doporučené dávky nevzniknou u deseti koček v průběhu 180 dnů od podání žádné příznaky onemocnění vzteklinou,
- v přirozených a experimentálních podmínkách nedojde u divoce žijících hlodavců k rozšíření virového kmene z jednoho zvířete na druhé,
- virový kmen má jeden nebo více stabilních genetických markerů, kterými může být rozlišen od jiných virových kmenů vztekliny.

Zkoušení šarže

Pokud byla zkouška účinnosti provedena s uspokojivými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může se tato zkouška vypustit při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula.

Zkoušky totožnosti

A. Po smíchání s monospecifickým vzteklinovým antisérem vakcína již není schopna infikovat vnímavé buněčné kultury, do nichž je naočkována.

B. Provede se zkouška na prokázání genetických markerů.

Zkoušky na čistotu

Cizí viry.

a) Po smíchání se specifickým neutralizačním vzteklinovým antisérem nevyvolá vakcína po vyočkování na vnímavou buněčnou kulturu cytopatický efekt. Neprokážou se známky hemaglutinačních nebo hemadsorpčních agens.

b) Vnímavá buněčná kultura se naočkuje ředěními vakcíny 1 : 10 a 1 : 1000 a inkubuje se při 37 °C. Po 2, 4 a 6 dnech se buňky obarví různými typy monoklonálních protilátek, které nereagují s vakcinačním kmenem, ale reagují s jinými kmeny viru vztekliny (např. uliční virus, Pasteurův kmen). Vakcína nevykazuje známky znečištění jinými vzteklinovými viry.

Bakterie a houby. Vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Titr viru. Vakcína se titruje ve vhodných buněčných kulturách. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně množství viru odpovídající nejmenšímu titru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použije se nejméně třicet pět lišek nejméně 3 měsíce starých prostých protilátek neutralizujících vzteklinu. Každému z nejméně dvaceti pěti zvířat se podá perorálně návnada uvedená v označení s vakcínou v množství odpovídajícím minimálnímu titru uvedenému v označení. Nejméně deset zvířat zůstává jako kontrolní. Všechna zvířata se pozorují po dobu 180 dnů. Žádné ze zvířat nevykazuje známky onemocnění vzteklinou. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že pozorovací dobu přežije nejméně dvacet pět vakcinovaných zvířat. Po 180 dnech po vakcinaci se všechny lišky intramuskulárně čelenžují virulentním kmenem viru vztekliny schváleným oprávněnou autoritou. Zvířata se pozorují 90 dnů po infekci. Zvířata, jež uhynula z důvodů, které nelze přisoudit vzteklině, se vyloučí. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, že se počet vakcinovaných zvířat ve zkoušce nesníží na méně než dvacet pět. Vakcína vyhovuje zkoušce, když nejvýše dvě z dvaceti pěti vakcinovaných zvířat (nebo statisticky odpovídající počet, když více než dvacet pět vakcinovaných zvířat bylo čelenžováno) vykazují příznaky onemocnění vzteklinou. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže nejméně devět kontrolních zvířat (nebo statisticky odpovídající počet, pokud více než deset kontrolních zvířat bylo čelenžováno) vykazuje příznaky vztekliny a v mozku těchto zvířat se metodou fluorescenčních protilátek nebo jinou spolehlivou metodou prokáže přítomnost viru vztekliny.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

V označení na obalu se uvede podstata genetického markeru virového kmene.

Vaccinum rhinotracheitidis infectivae bovinae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti infekční bovinní rinotracheitidě lyofilizovaná

Je to přípravek z jednoho nebo více oslabených kmenů viru infekční bovinní rinotracheitidy (bovinní herpesvirus 1).

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium*.

Virus se pomnoží ve vhodné buněčné kultuře (*5.2.4*). Virová suspenze se shromáždí a smíchá s vhodným stabilizačním roztokem. Tato směs se potom lyofilizuje.

Výběr vakcinačního kmene

Pro výrobu vakcíny se může použít jen takový kmen viru, který je prokazatelně uspokojivý z hlediska následujících charakteristik: bezpečnost (včetně toho, že nevyvolává potraty a neprochází

placentou), nevratnost virulence a imunogenita. Kmen může mít markery. K prokázání bezpečnosti (*5.2.6*) a účinnosti (*5.2.7*) se mohou použít následující zkoušky.

Bezpečnost. Pěti telatům ve stáří 3 měsíců nebo v nejnižším věku doporučeném pro vakcinaci, pokud je tento věk méně než 3 měsíce, která nemají protilátky proti infekční bovinní rinotracheitidě, se určeným způsobem podá množství viru odpovídající deseti dávkám vakcíny. Telata se pozorují 21 dní. Telata zůstávají zcela zdravá a neobjeví se významné místní nebo systémové reakce.

Schopnost vyvolat potrat a průchod placentou. Pro zkoušku se použije dvacet čtyři březích krav prostých protilátek proti infekční bovinní rinotracheitidě. Z toho je osm krav ve čtvrtém měsíci březosti, osm krav v pátém měsíci březosti, osm krav v šestém či sedmém měsíci březosti. Každé krávě se zamýšleným způsobem podá množství viru odpovídající deseti dávkám vakcíny. Krávy se pozorují až do konce březosti. Jestliže během pozorování dojde k abortu, provede se zkouška na přítomnost viru infekční bovinní rinotracheitidy. V plodu ani v placentě se nezjistí přítomnost viru ani virových antigenů. U narozených telat ještě před napitím kolostra se provede zkouška na protilátky proti infekční bovinní rinotracheitidě; nezjistí se žádné takové protilátky.

Nevratnost virulence. Od pěti telat použitých ve zkoušce na bezpečnost vakcíny se v době, kdy vakcinační virus může být snadno detekován, odeberou vhodné vzorky. Ověří se přítomnost a titr viru ve vzorcích. Vzorky se potom smíchají a podají intranazálně dvěma vnímavým telatům stejného stáří. V pěti dalších po sobě jdoucích pasážích se v každé pasáži provádí průkaz přítomnosti viru. Telata zůstanou zdravá a nezjistí se významné místní nebo systémové reakce.

Imunogenita. Zkouška popsaná v odstavci Stanovení účinnosti je vhodná pro průkaz imunogenity.

Zkoušení šarže

Pokud se provede stanovení účinnosti s uspokojivými výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, může se tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypustit, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkoušky totožnosti

A. Vakcína se rekonstituuje podle údajů v označení. Když se smíchá s vhodným množstvím monospecifického antiséra, rekonstituovaná vakcína již není schopna infikovat vnímavé buněčné kultury, do nichž je inokulována.

B. Ověří se markery kmene.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Dvěma vnímavým telatům ve stáří tři měsíce nebo v nejnižším věku doporučeném pro vakcinaci, pokud je tento věk méně než tři měsíce, se podá po deseti dávkách rekonstituované vakcíny způsobem uvedeným v označení. Telata se pozorují 21 dní. Vakcína vyhovuje zkoušce, pokud zvířata zůstávají zcela zdravá a nezjistí se významné místní nebo systémové změny.

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium*.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Cizí viry. Vakcína se neutralizuje monospecifickým antisérem a inokuluje se do vnímavých buněčných kultur. Kultura se udržují 14 dní a za 7 dní se provede pasáž. Buněčné kultury nejeví známky virové kontaminace.

Titr viru. Titr rekonstituované vakcíny se stanoví na vnímavých buněčných kulturách při teplotě podporující replikaci viru. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně množství viru odpovídající minimálnímu titru viru uvedenému v označení.

Stanovení účinnosti

Použijí se vnímavá telata 2 až 3 měsíce stará a prostá neutralizačních protilátek proti infekční bovinní rinotracheitidě. Pěti telatům se způsobem uvedeným v označení podá množství rekonstituované vakcíny obsahující množství viru, které odpovídá minimálnímu titru viru uvedenému v označení. Dvě telata jsou jako kontrola. Po 21 dnech se podá sedmi telatům intranazálně množství viru infekční bovinní rinotracheitidy, které u vnímavých telat vyvolá vznik typických příznaků onemocnění, jako je teplota, výtok z očí a nosu a ulcerace na nosní sliznici. Zvířata se pozorují 21 dní. Vakcinovaná telata mají jen mírné příznaky, kontrolní mají typické příznaky. Nejméně u čtyř z pěti vakcinovaných telat se v nazální mukóze zjistí maximální titr viru, který je stokrát nižší než průměr maximálního titru viru zjištěný u kontrolních telat. Průměrný počet dní, kdy je virus vylučován, je nejméně o tři dny kratší u telat vakcinovaných než u telat kontrolních.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Vaccinum rubellae vivum

Živá vakcína proti zarděnkám

Synonymum. Živá očkovací látka proti zarděnkám

Je to lyofilizovaná suspenze schváleného oslabeného kmene zarděnkového viru. Vakcína se ředí podle návodu bezprostředně před použitím. Vznikne čirá tekutina, jež může být zbarvena přítomným indikátorem pH.

Výroba

Výroba je založena na systému jednotné inokulace a buněčné banky. Výrobní postup prokazatelně poskytuje stejnorodou vakcínu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Pokud není prokázáno a schváleno jinak, neprochází virus v hotovém přípravku od základní kultury do přípravy vakcíny více pasážemi, než bylo použito u vakcíny, jejíž bezpečnost a účinnost byla prokázána v klinické studii.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že výrobek, bude-li zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Substrát pro pomnožení viru

Virus se pomnožuje v lidských diploidních buňkách (*5.2.3*).

Výchozí kultura viru

Kmen použitého zarděnkového viru má průkaznou dokumentaci, která obsahuje informace o jeho původu a následném zacházení. Aby se předešlo nezbytnému použití opic na zkoušku neurovirulence, připraví se výchozí kultura viru ve velkém množství a uchovává se při teplotách pod -20 °C, pokud je lyofilizována, anebo při teplotě pod -60 °C, pokud lyofilizována není. Pro pomnožení viru se použije jenom ta výchozí kultura, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Totožnost. Matečné a pracovní inokulum se prokáží jako zarděnkový virus v buněčné kultuře neutralizací specifickými protilátkami.

Koncentrace viru. Koncentrace viru v matečném a pracovním inokulu se stanovuje k zajištění stejnorodosti výroby.

Cizí antigeny (*2.6.16*). Pracovní výchozí kultura vyhovuje požadavkům na výchozí kulturu viru.

Neurovirulence (*2.6.18*). Pracovní výchozí kultura vyhovuje zkoušce na neurovirulenci živých virových vakcín. Pro zkoušku jsou vhodné opice *Macaca* a *Cercopithecus*.

Pomnožení viru a jeho sklizeň

Všechny pracovní postupy v buněčné bance a se získanými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostředí, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do růstových médií se může použít schválené zvířecí (nikoliv lidské) sérum, ale konečné médium pro udržování růstu buněk při pomnožování viru neobsahuje žádné zvířecí sérum. Sérum a trypsin, použité při přípravě buněčné suspenze a při přípravě médií, se zkouší na nepřítomnost cizích antigenů. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je fenolová červeň, a vhodné antibiotikum v nejnižší účinné koncentraci. Je však výhodnější mít po dobu výroby substrát bez antibiotik. Nejméně 500 ml výrobní buněčné kultury se odloží jako neinfikovaná buněčná kultura (kontrolní buňky). V průběhu pomnožování viru se kontroluje teplota inkubace a za 28 dní od naočkování nebo dříve se odebírá virus, a to najednou nebo opakovaně. Opakované odběry z jedné buněčné kultury se mohou spojit a považovat za jednu sklizeň viru.

K přípravě konečné várky vakcíny se použije jenom ta sklizeň viru, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Totožnost. Sklizeň viru obsahuje viry, které se prokáží jako zarděnkový virus v buněčné kultuře neutralizací specifickými protilátkami.

Koncentrace viru. Koncentrace viru ve sklizni viru se stanoví ke sledování stejnorodosti výroby a k výpočtu ředění pro konečnou vakcínu. Postupuje se tak, jak je uvedeno v odstavci Stanovení účinnosti.

Cizí antigeny (*2.6.16*).

Kontrolní buňky. Kontrolní buňky z přípravy buněčné kultury, z níž se získává virus, vyhovují zkoušce totožnosti a požadavkům na nepřítomnost cizích antigenů (*2.6.16*).

Konečná várka vakcíny

Virové sklizně, které vyhověly výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se naředí, jak je zapotřebí.

K přípravě konečné šarže se použije jenom ta konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícímu požadavku.

Bakterie a houby. Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*); na každou živnou půdu se použije 10 ml zkoušené konečné várky vakcíny.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených nádobek a lyofilizuje se, až obsah vlhkosti dosáhne hodnoty příznivé pro stabilitu vakcíny. Nádobky se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a přístupu vlhkosti.

K použití se propustí jenom ta šarže, která vyhovuje požadavku na tepelnou stabilitu a požadavkům uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Jestliže u konečné várky vakcíny byla s vyhovujícím výsledkem provedena zkouška na hovězí sérový albumin, může být tato zkouška u šarže vypuštěna.

Tepelná stabilita. Provede se zrychlená rozkladná zkouška zahřátím lyofilizované vakcíny na 37 °C po 7 dní. Koncentrace viru po této době neklesne od výchozí hodnoty o více než 1 $\log_{10}$ a v každém případě musí být nejméně 10^3 TKD_{50} v jedné dávce.

Zkouška totožnosti

Zkoušený přípravek rozpuštěný předepsaným způsobem a smíchaný se specifickým protizarděnkovým sérem není již schopen infikovat vnímavé buněčné kultury.

Zkoušky na čistotu

Bakterie a houby. Rozpuštěný zkoušený přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Hovězí sérový albumin. Nejvýše 50 ng v jedné lidské dávce, stanoveno vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení účinnosti

Infekční virové částice se stanoví nejméně trojmo, při čemž se použije nejméně pět buněčných kultur pro každé 0,5 $\log_{10}$ sériové ředění nebo jinou metodu se stejnou přesností. K ověření každé zkoušky se použije vhodný virový porovnávací přípravek. Stanovená koncentrace viru je rovna nejméně koncentraci uvedené v označení; minimální koncentrace uvedená v označení je nejméně 10^3 $CCID_{50}$ v jedné lidské dávce. Zkoušku lze hodnotit pouze v případě, jestliže interval spolehlivosti (P = 0,95) logaritmu koncentrace viru je menší než ±0,3.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- kmen viru použitý k přípravě vakcíny,
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny,
- minimální koncentrace viru,
- varování před stykem s dezinfekčními prostředky,
- doba, v níž se vakcína po rozpuštění musí použít,
- že vakcína se nesmí podat těhotným ženám a že žena nesmí 2 měsíce po očkování otěhotnět.

Vaccinum tetani adsorbatum

Adsorbovaná vakcína proti tetanu

Synonymum. Adsorbovaná očkovací látka proti tetanu

Je to tetanický toxoid adsorbovaný na minerální nosič. Toxoid se připravuje formaldehydovou inaktivací toxinu vytvořeného při růstu kultury mikroba *Clostridium tetani*.

Výroba

Várka přečištěného toxoidu

Výchozí pracovní kultury, které vytvářejí tetanický toxin pro výrobu toxoidu, se připravují definovaným systémem jednotné inokulace, který zachovává jejich toxinogenitu a v případě potřeby ji obnovuje novým cíleným výběrem. Vysoce toxinogenní kmen *Clostridium tetani* známého původu a udržování se pěstuje ve vhodné tekuté živné půdě. Na konci kultivace se zkouší čistota každé kultury a kontaminované kultury se vyřadí. Asepticky se shromáždí živné půdy obsahující toxin. Kontroluje se obsah toxinu (Lf v ml), aby bylo možno sledovat pravidelnost výroby. Jednotlivé sklizně se mohou spojit, aby se připravila várka přečištěného toxoidu. Toxin se čistí, aby se odstranily složky, které by mohly u člověka způsobit nežádoucí reakce. Vyčištěný toxin se detoxikuje formaldehydem takovou metodou, která zabrání poškození imunogenní účinnosti toxoidu a jeho zpětné přeměně na toxin, zvláště působením tepla. Přečištění lze také provést až po detoxikaci.

K přípravě konečné várky vakcíny se může použít pouze várka přečištěného toxoidu, který vyhovuje následujícím požadavkům.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Nepřítomnost tetanického toxinu. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, jež by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně nejméně 500 Lf přečištěného toxoidu v 1 ml. Jestliže se u některého ze zvířat během 21 dnů následujících po injekci projeví příznaky tetanu nebo na něj zvíře uhyne, toxoid nevyhovuje zkoušce. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, toxoid nevyhovuje.

Stálost toxoidu. Za použití stejného tlumivého roztoku jako pro konečnou vakcínu, ale bez sorbentu se připraví takové ředění přečištěného toxoidu, aby odpovídalo koncentraci v konečné vakcíně. Naředěný toxoid se rozdělí na dvě stejné části, které se uchovávají po dobu šesti týdnů; jedna část při (5 ± 3) °C a druhá při 37 °C. Pak se oba vzorky podrobí vhodné citlivé zkoušce na přítomnost aktivního tetanického toxinu, jako je podání myším nebo morčatům.

Toxoid vyhovuje zkoušce, jestliže ani jeden ze vzorků nevyvolá žádné známky toxické reakce odpovídající tetanickému toxinu.

Antigenní čistota. Nejméně 1000 Lf na 1 mg bílkovinného dusíku.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví adsorpcí vhodného množství přečištěného tetanického toxoidu na hydratovaný fosforečnan hlinitý, hydroxid hlinitý nebo fosforečnan vápenatý; vzniklá směs je přibližně izotonická s krví. Je možné přidat vhodné protimikrobní konzervační látky. Některé z nich, zvláště fenolového typu, působí nepříznivě na antigenní aktivitu, a nelze je tedy použít.

K přípravě šarže se může použít pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Protimikrobní konzervační látky. 85 % až 115 % zamýšleného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobní konzervační látky vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Provede se zkouška na sterilitu; na každou živnou půdu se použije 10 ml.

Účinnost. Provede se zkouška popsaná ve stati Stanovení účinnosti.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů. Obaly se uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci.

K použití může být uvolněna pouze šarže, která odpovídá všem požadavkům dále uvedeným v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti. Pokud byly zkouška specifické neškodnosti, stanovení obsahu volného formaldehydu a protimikrobní konzervační látky a stanovení účinnosti provedeny s vyhovujícími výsledky u konečné várky vakcíny, mohou se u šarže vypustit.

Zkouška totožnosti

Ve zkoušeném přípravku se rozpustí takové množství *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Inkubuje se 16 h při 37 °C a pak se odstřeďuje, dokud se nezíská čirý supernatant. Tento supernatant reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

Zkoušky na čistotu

Specifická neškodnost. Pěti zdravým morčatům o hmotnosti 250 g až 350 g, kterým před tím nebyla podána žádná látka, která by mohla narušit zkoušku, se vstříkne podkožně pětinásobek lidské dávky uvedené v označení. Jestliže během 21 dnů po injekci kterékoli ze zvířat uhyne za příznaků tetanu nebo se u něj jeho příznaky projeví, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno zvíře, zkouška se opakuje. Jestliže při opakované zkoušce uhyne více než jedno zvíře, přípravek nevyhovuje.

Hliník. Pokud se jako nosič použije hydratovaný fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Vápník. Pokud se jako nosič použije fosforečnan vápenatý, přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Volný formaldehyd. Přípravek vyhovuje zkoušce předepsané v článku *Vaccina ad usum humanum.*

Protimikrobní konzervační látky. Nejméně nejnižší prokazatelně účinné množství, nejvýše 115 % deklarovaného množství. Pokud je třeba, stanoví se obsah protimikrobních konzervačních látek vhodnou chemickou metodou.

Sterilita (*2.6.1*). Vyhovuje zkoušce na sterilitu.

Stanovení účinnosti

Provede se jedno z předepsaných stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu (*2.7.8*).

Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu.

Dolní mez spolehlivosti ($P = 0{,}95$) stanovené účinnosti je nejméně 40 m.j. v jedné lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:

- minimální množství mezinárodních jednotek v jedné lidské dávce,
- název a množství nosiče,
- že se přípravek před použitím roztřepe,
- že přípravek nesmí zmrznout.

Vaccinum tetani ad usum veterinarium

Vakcína proti tetanu pro veterinární použití

Připravuje se z tekuté kultury vhodného kmene mikroba *Clostridium tetani*. Filtrát kultury se inaktivuje takovým způsobem, aby se odstranila toxicita, ale imunogenita zůstala zachována.

Takto vytvořený toxoid se může koncentrovat a čistit a může se přidat vhodné adjuvans.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Při vývoji vakcíny se prokáže její bezpečnost pro každý zvířecí druh, jemuž je určena.

Zkoušky totožnosti

Provede se zkouška totožnosti A, nebo pokud to povaha adjuvans dovoluje, zkouška B.

A. Zkoušený přípravek se podá zdravým vnímavým zvířatům a prokáže schopnost vyvolat tvorbu protilátek proti neurotoxinu *Cl. tetani* nebo schopnost ochránit před paralytickým účinkem tohoto toxinu.

B. Zkoušený přípravek se upraví tak, že se toxoid oddělí od adjuvancia. Pro látky adsorbované na hydroxid hlinitý je vhodná následující úprava: v přípravku se rozpustí tolik *citronanu sodného R*, aby výsledná koncentrace byla 100 g/l. Nechá se 16 h stát při 37 °C a odstřeďuje se, dokud se nezíská čirý supernatant. Roztok obsahující toxoid reaguje s vhodným tetanickým antitoxinem za vzniku precipitátu.

Zkoušky na čistotu

Toxicita. Pěti zdravým morčatům hmotnosti 350 g až 450 g, která v minulosti nebyla léčena žádnou látkou, která by mohla ovlivnit tuto zkoušku, se podkožně vstříkne na dvě místa po 5 ml zkoušeného přípravku rozdělených na dvě stejné dávky. Zvířata nemají významné místní ani celkové reakce. Projeví-li se u zvířat během 21 dní po očkování příznaky onemocnění nebo pokud uhynou na tetanus, přípravek nevyhovuje. Pokud z nespecifických příčin uhyne více než jedno morče, zkouška se opakuje. Jestliže některé ze zvířat uhyne i při opakované zkoušce, přípravek nevyhovuje.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Stanovení účinnosti

Účinnost se stanoví metodou A nebo metodou B.

Metoda A

Použije se deset morčat vážících nejméně 250 g. Každému se podkožně vstříkne takové množství zkoušeného přípravku, které nepřesahuje nejnižší dávku uvedenou v označení jako první dávka. Za 28 dní se provede přeočkování dávkou, která nepřesahuje nejnižší dávku uvedenou jako druhá dávka. Za 14 dní po přeočkování se morčatům odebere krev a vytvoří se směsný vzorek sér.

Účinnost směsného vzorku séra je nejméně 7,5 m.j. tetanického antitoxinu v mililitru kromě zkoušeného přípravku určeného pro lichokopytníky, u něhož je účinnost směsného vzorku séra nejméně 30 m.j. v mililitru.

Pokud je tetanická vakcína pro veterinární použití součástí smíšené vakcíny, není určena pro lichokopytníky, a zkouší-li se ostatní složky vakcíny běžně na králících, může se zkouška účinnosti provést i u tetanické složky na králících. Použije se deset králíků 3 až 6 měsíců starých. Účinnost směsného vzorku séra je potom nejméně 2,5 m.j. v mililitru.

Mezinárodní jednotkou je specifická účinnost neutralizující tetanický toxin obsažená v deklarovaném množství mezinárodního standardu, který pozůstává z určitého množství sušeného imunního koňského séra. Hodnotu účinnosti mezinárodního standardu v mezinárodních jednotkách vyhlašuje Světová zdravotnická organizace.

Účinnost směsného vzorku sér morčat (nebo králíků) se stanoví porovnáním dávky nezbytné k ochraně myší nebo jiných vhodných zvířat proti toxickému účinku neměnné zkušební dávky tetanického toxinu s dávkou referenčního přípravku tetanického antitoxinu kalibrovaného v mezinárodních jednotkách nezbytnou k vytvoření shodné ochrany. K tomuto porovnání je zapotřebí vhodný tetanický toxin, který se použije jako zkušební toxin. Dávka zkušebního toxinu se stanoví proti referenčnímu přípravku, účinnost zkoušeného séra se stanoví proti referenčnímu přípravku za použití zkušebního toxinu. Pokud není uvedeno jinak, oprávněná autorita upřednostňuje pro vyhodnocení zkoušky letální metodu. Pro tuto metodu je shodný počet pokusných zvířat i postup zkoušky s paralytickou metodou. Limitním konečným bodem je však místo paralýzy úhyn zvířete a místo Lp/10 a 50% paralytické dávky se používá dávka L+/10 a LD_{50}.

Příprava zkušebního toxinu. Ze sterilního filtrátu osmidenní až desetidenní kultury *Cl. tetani* v tekuté živné půdě se připraví zkušební toxin. Může se připravit přidáním tohoto filtrátu do glycerolu v poměru jednoho objemového dílu filtrátu k jednomu až dvěma objemovým dílům glycerolu. Roztok zkušebního toxinu se může uchovávat při teplotě 0 °C nebo slabě nižší. Toxin se může též vhodným způsobem lyofilizovat.

Zkušební toxin se vybírá po stanovení dávky Lp/10 pro myši a 50% paralytické dávky. Vhodný toxin obsahuje nejméně 1000násobek 50% paralytické dávky v jedné dávce Lp/10.

Dávka Lp/10 (Limes paralyticum). Je to nejnižší množství toxinu, které smícháno s 0,1 m.j. antitoxinu a podkožně vstříknuto myším (nebo morčatům) způsobí 4. den po podání nebo dříve tetanickou paralýzu zvířat.

50% paralytická dávka. Je to množství toxinu, které po subkutánním podání myším (nebo morčatům) způsobí 4. den po podání nebo dříve tetanickou paralýzu poloviny zvířat.

Stanovení zkušební dávky toxinu. Referenční přípravek se rozpustí nebo zředí ve vhodné tekutině tak, aby v 1 ml obsahoval 0,5 m.j. Množství toxinu se změří nebo odváží a zředí se vhodnou tekutinou. Směsi roztoku referenčního přípravku a roztoku zkušebního toxinu se připraví tak, aby každá

směs obsahovala v podávaném objemu 0,1 m.j. antitoxinu a jeden ze řady stoupajících objemů zkušebního toxinu (objemy zkušebního toxinu se mezi sebou liší nejvýše o 20 % a řada přesahuje očekávaný limitní bod). Každá směs se doplní vhodnou tekutinou na stejný konečný objem (0,4 ml až 0,6 ml pro myši nebo 4,0 ml pro morčata). Směsi se 60 min nechají stát ve tmě. Pro každou směs se použijí nejméně dvě myši, jimž se zvolená dávka vstříkne podkožně. Zvířata se pozorují 96 h a denně se zaznamenává u každé skupiny zvířat stupeň rozvoje tetanických příznaků. Zkouška se nejméně jedenkrát opakuje a vypočte se zkušební dávka jako průměr jednotlivých zkoušek. Zkušební dávka je množství toxinu obsažené v té směsi, která způsobí tetanickou paralýzu poloviny celkového počtu zvířat, jimž se toxin podal.

Po stanovení zkušební dávky toxinu se může připravit jeho koncentrovaný roztok ve směsi jednoho objemového dílu roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a jednoho až dvou objemových dílů *glycerolu R*. Tento koncentrovaný roztok se může skladovat zmrazený a před použitím se zředí. Specifická aktivita takového roztoku se v častých intervalech stanoví znovu.

Stanovení účinnosti zkoušeného séra.

Předběžná zkouška: Odměří se nebo odváží určité množství zkušebního toxinu a zředí se vhodnou tekutinou tak, aby roztok obsahoval 5 zkušebních dávek v mililitru (roztok zkušebního toxinu). Směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra se připraví tak, aby každá směs obsahovala v objemu zvoleném pro injekci zkušební dávku toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra. Každá směs se doplní vhodnou tekutinou na stejný konečný objem. Směsi se 60 min nechají stát chráněny před světlem. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata; každému se vstříkne podkožně zvolené množství směsi. Zvířata se pozorují 96 h a denně se zaznamenává u každé skupiny stupeň rozvoje tetanických příznaků. Podle výsledků se zvolí vhodné směsi pro konečnou zkoušku.

Konečná zkouška: Směsi roztoku zkušebního toxinu a zkoušeného séra se připraví tak, aby každá směs obsahovala v objemu zvoleném pro injekci zkušební dávku toxinu a jeden z řady stoupajících objemů zkoušeného séra vzájemně se lišících nejvýše o 20 %, přičemž řada přesahuje konečný limitní bod stanovený v předběžné zkoušce. Aby se potvrdila zkušební dávka toxinu, připraví se další směsi obsahující v celkovém objemu zvoleném pro injekci stejné množství zkušebního toxinu a stoupající objemy referenčního přípravku (se střední hodnotou 0,1 m.j.). Každá směs se doplní vhodnou tekutinou na shodný konečný objem. Směsi se 60 min nechají stát chráněny před světlem. Pro každou směs se použijí nejméně dvě zvířata; každému se podkožně vstříkne zvolené množství. Zvířata se pozorují 96 h a denně se zaznamenává u každé skupiny stupeň rozvoje tetanických příznaků. Zkoušená směs, která obsahuje 0,1 m.j. v podaném objemu, je ta směs, která způsobí tetanickou paralýzu shodného nebo téměř shodného počtu zvířat jako referenční směs obsahující 0,1 m.j. v podaném objemu. Stanovení se nejméně jedenkrát opakuje a vypočítá se průměr všech platných výsledků. Výsledky jsou platné pouze tehdy, když výsledek referenčního přípravku je v rozmezí ±20 % od očekávané hodnoty.

Intervaly spolehlivosti (P = 0,95) jsou stanoveny takto:
- 85 % až 114 %, použila-li se dvě zvířata na dávku,
- 91,5 % až 109 %, použila-li se tři zvířata na dávku,
- 93 % až 108 %, použilo-li se šest zvířat na dávku.

Metoda B

Tato metoda se může použít pouze pro určité přípravky. Metoda není především vhodná pro polyvalentní vakcíny nebo pro vakcíny s olejovým adjuvans.

Provede se stanovení účinnosti (adsorbované) vakcíny proti tetanu (*2.7.8*) jednou z popsaných metod.Stanovená účinnost je nejméně 150m.j.v nejnižší dávce, která je uvedena v označení na obalu.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

V označení na obalu se uvede:

- že přípravek se před použitím roztřepe,
- u přípravků obsahujících adjuvans jeho název.

Vaccinum tuberculosis (BCG) cryodesiccatum

Vakcína proti tuberkulóze (BCG) lyofilizovaná

Synonymum. Očkovací látka proti tuberkulóze

Je to přípravek obsahující živé bakterie získané z kultury bacila Calmettova a Guérinova (*Mycobacterium bovis* BCG), jejichž schopnost chránit proti tuberkulóze byla prokázána.

Výroba

Vakcínu připravuje pracovní skupina složená ze zdravých osob, které nepracují s jiným infekčním agens; především nemohou pracovat s virulentními kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, ani nemohou být vystaveni známému riziku nákazy tuberkulózou. Přípravek je citlivý na sluneční světlo: postupy jeho přípravy jsou uspořádány tak, aby všechny kultury a vakcíny byly chráněny před přímým slunečním světlem a ultrafialovým zářením při všech stupních výroby, zkoušení a uchovávání.

Příprava je založena na systému jednotné inokulace. Výrobní postup prokazatelně zajišťuje výrobu stejnorodé vakcíny, která u člověka vyvolává odpovídající senzitivitu na tuberkulin, která má přijatelnou protektivní účinnost na zvířatech a je bezpečná. Vakcína se připravuje z kultur, které pocházejí z matečného inokula při co nejmenším možném počtu subkultur a ve všech případech nejvýše osmi subkulturami. Během těchto subkultivací se přípravek lyofilizuje nejvýše jedenkrát.

Bakteriální inokula

Kmen pro matečné iokulum se vybere a udržuje tak, aby se zachovala jeho stabilita, schopnost senzibilizovat člověka a morče na tuberkulin a chránit zvířata proti tuberkulóze a také aby byl relativně nepatogenní pro člověka a laboratorní zvířata. Vlastnosti použitého kmene mají být doloženy historickými záznamy o jeho původu a dalším následným zacházením.

Z primární pracovní kultury se připraví vhodná šarže vakcíny, která se uchovává jako porovnávací vakcína. Je-li připraveno nové pracovní inokulum, provedou se s šarží vakcíny z něho připravené vhodné zkoušky na pozdní přecitlivělost na morčatech; vakcína se prokazatelně signifikantně neliší ve své účinnosti od porovnávací vakcíny.

Pro pomnožení se použije jen to pracovní inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům.

Totožnost. Prokáže se, že bakterie v pracovním inokulu jsou *Mycobacterium bovis* BCG.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*), na každou živnou půdu se použije 10 ml. Pracovní inokulum vyhovuje zkoušce na sterilitu kromě přítomnosti mykobakterií.

Virulentní mykobakterie. Pracovní inokulum se zkouší postupem uvedeným ve zkouškách na čistotu, použije se deset morčat.

Schopnost indukovat odpověď morčat. Schopnost pracovního inokula indukovat přecitlivělost na tuberkulin se prokáže na morčatech.

Pomnožení a sklizeň

Bakterie se kultivují ve vhodné živné půdě nejdéle 21 dní v povrchové nebo hloubkové kultuře. Živná půda neobsahuje složky, o nichž je známo, že u člověka způsobují toxickou nebo alergickou reakci nebo že způsobují přeměnu bakterií na kmen virulentní pro morčata. Kultura se sklidí a suspenduje ve sterilní živné půdě, která chrání životnost vakcíny, což se určí vhodnou metodou stanovení počtu živých zárodků.

Konečná várka vakcíny

Konečná várka vakcíny se připraví z jedné sklizně nebo spojením jednotlivých sklizní. Může se přidat stabilizátor, jestliže stabilizátor vadí při stanovení koncentrace bakterií v konečné várce vakcíny, provede se stanovení ještě před přidáním stabilizátoru.

Pro přípravu šarže vakcíny se použije jen ta konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům.

Virulentní mykobakterie. Zkouší se postupem uvedeným ve Zkouškách na čistotu.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*), na každou živnou půdu se použije 10 ml. Konečná várka vakcíny vyhovuje zkoušce na sterilitu kromě přítomnosti mykobakterií.

Stanovení počtu živých zárodků. Stanovení počtu živých zárodků v mililitru se provede na pevné živné půdě vhodnou metodou pro zkoušenou vakcínu nebo se provede stanovení adenosintrifosfatu bioluminiscenční reakcí. Provede se současně s referenčním přípravkem stejného kmene.

Koncentrace bakterií. Celková koncentrace bakterií se stanoví vhodnou metodou buď přímo stanovením bakteriální hmoty, nebo nepřímo zákalovou metodou kalibrovanou podle množství mikroorganismů. Je-li bakteriální koncentrace stanovena před přidáním stabilizátoru, stanoví se koncentrace v konečné várce vakcíny přepočtem. Celková koncentrace bakterií je v rozmezí schváleném pro jednotlivé přípravky.

Poměr počtu živých zárodků k celkové koncentraci bakterií není nižší než poměr schválený pro jednotlivé přípravky.

Šarže

Konečná várka vakcíny se rozplní do sterilních obalů a lyofilizuje se tak, aby zbytková vlhkost byla vhodná pro stabilitu vakcíny; obaly se uzavřou buď ve vakuu, nebo v plynu, který vakcíně neškodí.

Doba použitelnosti může být nejvýše 4 roky od data sklizně kromě případu, kdy se naplněné a uzavřené obaly skladují při teplotě -20 °C nebo nižší.

Pouze šarže, která vyhovuje dále uvedeným požadavkům na počet živých zárodků a jednotlivým požadavkům uvedeným v odstavcích Zkoušky totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení počtu zárodků, může být uvolněna k použití. Jestliže zkouška na přítomnost virulentních mykobakterií byla provedena s vyhovujícím výsledkem u konečné várky vakcíny, je možno ji vynechat u šarže. Je-li provedena zkouška na zvýšenou kožní dráždivost s vyhovujícím výsledkem u pracovního inokula a u pěti po sobě následujících šarží z něho připravených, lze tuto zkoušku u šarže vynechat.

Počet živých zárodků. Počet živých zárodků v mililitru rekonstituované vakcíny se stanoví na pevné živné půdě metodou, která je vhodná pro zkoušenou vakcínu, nebo se provede stanovení

adenosintrifosfatu bioluminiscenční reakcí. Poměr počtu živých zárodků před a po lyofilizaci není nižší než hodnota určená pro daný přípravek.

Zkoušky totožnosti

Totožnost zkoušeného přípravku se prokáže mikroskopickým vyšetřením přítomnosti acidorezistentních bacilů v obarvených nátěrech a při kultivaci na pevných půdách růstem kolonií charakteristického vzhledu.

Zkoušky na čistotu

Virulentní mykobakterie. Každému ze šesti morčat hmotnosti 250 g až 400 g, jimž nebyla podána žádná látka, která by mohla ovlivnit tuto zkoušku, se podkožně nebo nitrosvalově vstříkne množství vakcíny odpovídající nejméně padesáti lidským dávkám. Zvířata se pozorují nejméně 42 dní. Po uplynutí této doby se morčata usmrtí a při pitvě se hledají známky infekce tuberkulózou. Menší reakce v místě aplikace se nehodnotí. Zvířata, která uhynou během sledované doby, se také vyšetřují na tuberkulózu. Vakcína vyhovuje zkoušce, pokud žádné ze zvířat nevykazuje známky tuberkulózy a pokud během sledované doby neuhyne více než jedno morče. Jestliže během sledované doby uhynou dvě morčata a pitvou se neprokáže tuberkulóza, zkouška se opakuje na dalších šesti morčatech. Vakcína vyhovuje, jestliže během 42 dnů po podání neuhyne více než jedno morče a pitva neprokáže žádné známky tuberkulózy.

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*) kromě přítomnosti mykobakterií.

Nadměrná kožní reaktivita. Použije se šest zdravých bílých nebo světle zbarvených morčat hmotnosti nejméně 250 g, jimž nebyla podána žádná látka, která by mohla tuto zkoušku ovlivnit. Podle randomizačního plánu se každému morčeti intradermálně podá 0,1 ml rekonstituované vakcíny a dalších dvou desetinásobných sériových ředění a stejné dávky porovnávací vakcíny. Léze v místě podání se sledují 4 týdny. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže reakce, které vyvolala, se výrazně neliší od reakcí vyvolaných porovnávací vakcínou.

Teplotní stabilita. Vzorky lyofilizované vakcíny se ponechají 4 týdny při 37 °C. V zahřáté i nezahřáté vakcíně se stanoví počet živých zárodků postupem uvedeným dále. Rozdíl počtu živých zárodků v zahřáté vakcíně oproti nezahřáté je nejvýše 20 %.

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení počtu zárodků

Počet živých zárodků v rekonstituované vakcíně se stanoví na pevné živné půdě metodou vhodnou pro zkoušenou vakcínu. Počet je v rozmezí uvedeném v označení. Současně se stanoví počet živých zárodků v porovnávací vakcíně.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum*.

V označení na obalu se uvede:
- nejnižší a nejvyšší počet živých zárodků v mililitru rekonstituované vakcíny,
- že se vakcína chrání před přímým slunečním světlem,
- že se vakcína použije bezprostředně po otevření a zbytek se znehodnotí,
- věková skupina, pro kterou je vakcína určena,
- dávka pro každou věkovou skupinu.

Vaccinum varicellae vivum

Živá vakcína proti planým neštovicím

Je to lyofilizovaný přípravek oslabeného kmene OKA *Herpesvirus varicellae.* Vakcína se podle údajů v označení rekonstituuje bezprostředně před použitím; vznikne čirá tekutina, která může být zbarvena vzhledem k přítomnosti indikátoru pH.

Výroba

Výroba vakcíny je založena na systému jednotné inokulace a na systému buněčných bank. Výrobní postup prokazatelně poskytuje stále stejnou živou vakcínu přiměřené imunogenity a bezpečnosti pro člověka. Virus v konečné vakcíně neprošel více než třiceti osmi pasážemi v buněčných kulturách od viru, který byl původně izolován.

Výrobní postup se validuje, aby se prokázalo, že pokud bude výrobek zkoušen, vyhoví zkoušce na neškodnost imunních sér a vakcín pro humánní použití (*2.6.9*).

Substrát pro pomnožení viru

Virus se pomnožuje v lidských diploidních buňkách (*5.2.3*).

Virové inokulum

Kmen viru planých neštovic je určen jako OKA podle původních záznamů, které obsahují informaci o původu viru a následné manipulaci s ním. Virus nikdy nebyl pasážován v kontinuální buněčné linii. Inokulum se připravuje na stejném druhu buněk, jaký se použije při výrobě konečné vakcíny. Aby se předešlo nadměrnému používání opic ve zkoušce na neurovirulenci, připraví se virové inokulum ve velkém množství a uchovává se lyofilizované při teplotách nižších než -20 °C nebo, pokud není lyofilizované, při teplotách nižších než -60 °C.

Pouze virové inokulum, které vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k pomnožení viru.

Zkouška totožnosti. V matečných i pracovních inokulech se prokáže virus planých neštovic séroneutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Koncentrace viru v matečných i pracovních inokulech se stanoví tak, jak je předepsáno ve zkoušce Stanovení účinnosti, a slouží ke sledování stálosti výroby.

Cizí agens (*2.6.16*). Pracovní inokulum vyhovuje požadavkům na inokula živých virových vakcín; na zkoušku v buněčných kulturách se odebírá vzorek 50 ml.

Neurovirulence (*2.6.18*). Pracovní inokulum vyhovuje zkoušce živých virových vakcín na neurovirulenci.

Pomnožování a sklizeň viru

Všechny práce s buněčnou bankou a s následnými buněčnými kulturami se provádějí za aseptických podmínek v prostředí, kde se nepracuje s jinými buňkami. Do živných médií se může použít schválené zvířecí (nikoliv lidské) sérum. Sérum a trypsin použité k přípravě buněčných suspenzí a médií jsou prokazatelně prosty cizích agens. Médium pro buněčné kultury může obsahovat indikátor pH, jako je fenolová červeň, a schválená antibiotika v nejnižší účinné koncentraci. Při výrobě se dává přednost substrátu bez antibiotik. Jako nenaočkovaná kontrola (kontrolní buňky) se uchovává 5 % buněk použitých k výrobě vakcíny, nejméně však 50 ml. Infikované buňky tvořící jednu sklizeň se promyjí, uvolní se s povrchu podložky a smíchají se. Buněčná suspenze se lyzuje ultrazvukem.

Pouze sklizeň viru, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě konečné várky vakcíny.

Zkoušky totožnosti. Sklizeň viru obsahuje virus, který se dokáže jako virus planých neštovic séroneutralizační zkouškou v buněčné kultuře za použití specifických protilátek.

Koncentrace viru. Koncentrace infekčního viru ve sklizni viru se stanoví tak, jak je předepsáno v odstavci Stanovení účinnosti, aby se zajistila stálost výroby a aby se stanovilo ředění, jež se má použít pro konečnou várku vakcíny.

Cizí agens (*2.6.16*). Pro zkoušku na buněčných kulturách se použije 50 ml.

Kontrolní buňky. Kontrolní buňky výrobní buněčné kultury, z níž se odvozuje jednotlivá sklizeň, vyhovují zkoušce totožnosti a požadavkům na cizí agens (*2.6.16*).

Konečná várka vakcíny

Sklizně viru, které vyhovují výše uvedeným zkouškám, se spojí a vyčeří, aby se odstranily buňky. Může se přidat vhodný stabilizátor a spojené sklizně se zředí vhodným způsobem.

Pouze konečná várka vakcíny, která vyhovuje následujícím požadavkům, se může použít k přípravě šarže.

Bakterie a houby. Provede se zkouška na sterilitu (*2.6.1*); na každou půdu se použije 10 ml.

Šarže

Konečná várka vakcíny se asepticky rozplní do sterilních zabezpečených obalů a lyofilizuje se na obsah vlhkosti, která je prokazatelně vhodná pro stabilitu vakcíny. Potom se obaly uzavřou tak, aby se předešlo kontaminaci a vniknutí vlhkosti.

Pouze šarže, která vyhovuje z hlediska všech požadavků uvedených v odstavcích Zkouška totožnosti, Zkoušky na čistotu a Stanovení účinnosti, se může uvolnit k použití. Pokud byla zkouška na bovinní sérumalbumin provedena s uspokojivým výsledkem na konečné várce vakcíny, může být u šarže vypuštěna.

Zkouška totožnosti

Když se vakcína rekonstituovaná podle údajů v označení smíchá se specifickými protilátkami na *Herpesvirus varicellae*, není již schopna infikovat vnímavé buněčné kultury.

Zkoušky na čistotu

Bakterie a houby. Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na sterilitu (*2.6.1*).

Bovinní sérumalbumin. Nejvýše 0,5 μg v lidské dávce; stanoví se vhodnou imunochemickou metodou (*2.7.1*).

Voda, semimikrostanovení (*2.5.12*). Nejvýše 3,0 %.

Stanovení účinnosti

Infekční virus se titruje na nejméně deseti buněčných kulturách pro každé čtyřnásobné ředění nebo metodou o stejné přesnosti. K validaci každé zkoušky se použije vhodný referenční virový přípravek. Koncentrace viru je nejméně 2,0 . 10^3 PFU v lidské dávce.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum humanum.*

V označení se uvede:

- virový kmen použitý k přípravě vakcíny,
- typ a původ buněk použitých k přípravě vakcíny,
- varování před stykem s dezinfekčními prostředky,
- minimální koncentrace viru,
- že se vakcína nepodává těhotným ženám,
- v jaké době po rekonstituci je třeba vakcínu použít.

Vaccinum variolae gallinaceae vivum cryodesiccatum

Živá vakcína proti neštovicím drůbeže lyofilizovaná

Je to přípravek z jednoho nebo více oslabených kmenů holubího pox-viru, slepičího pox-viru nebo krůtího pox-viru.

Výroba

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Každý virus se pomnoží na chorioalantoidních membránách kuřecích embryí z chovů prostých specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nebo ve vhodných buněčných kulturách (*5.2.4*). Jsou-li buněčné kultury ptačího původu, jsou získány z chovů prostých specifikovaných patogenů. Virové suspenze se shromáždí, smíchají s vhodnou stabilizující tekutinou a lyofilizují se.

Výběr vakcinačního kmene

Pro přípravu vakcíny se může použít pouze virový kmen prokazatelně uspokojivý z hlediska imunogenity a bezpečnosti.

Zkoušení šarže

Pokud se provedou zkouška na viry ptačí leukózy, zkouška na cizí viry na kuřecích embryích a zkouška na adenoviry, reoviry a viry ptačí laryngotracheitidy s uspokojujícími výsledky na reprezentativní šarži vakcíny, mohou se při rutinních kontrolách jiných šarží vakcíny připravených z téhož inokula vypustit, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Pokud bylo stanovení účinnosti provedeno na reprezentativní šarži vakcíny s uspokojivými výsledky, může se tato zkouška při rutinní kontrole jiných šarží vakcíny připravených ze stejného inokula vypustit, pokud k tomu dá souhlas oprávněná autorita.

Zkouška totožnosti

Rekonstituovaná vakcína chrání vnímavá kuřata proti neštovicím drůbeže.

Zkoušky na čistotu

Bezpečnost. Použije se nejméně deset kuřat z chovu prostého specifikovaných patogenů nejnižšího stáří udávaného pro vakcinaci. Každému kuřeti se podá způsobem uvedeným v označení nebo v příbalovém letáku pro tuto kategorii zvířat deset dávek vakcíny rekonstituované tak, aby se získala koncentrace vhodná pro zkoušku. Kuřata se pozorují 21 dní. Jestliže v období pozorování uhynou více než dvě kuřata z příčin, které nelze přisoudit vakcíně, zkouška se opakuje. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže žádné z kuřat neuhyne z příčin, které lze přisoudit vakcíně, nebo nevykazuje jiné než mírné, přechodné místní příznaky.

Cizí viry zkouškou na kuřecích embryích (*2.6.3*). Co možná nejvíce neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí viry při použití kuřecích embryí provedené bez provedení pasáží; opomíjejí se abnormality způsobené vakcinačním virem, který nebyl neutralizován.

Cizí antigeny zkouškou na kuřatech (*2.6.6*). Rekonstituovaná vakcína vyhovuje zkoušce na cizí antigeny při použití kuřat.

Viry ptačí leukózy (*2.6.4*). Co možná nejvíce neutralizovaná vakcína vyhovuje zkoušce na viry s následujícími modifikacemi; nedělají se subkultury fibroblastů a místo komplement-fixační zkoušky se provádí ELISA s použitím IgG specifického pro skupinově specifický antigen ptačí leukózy.

Adenoviry, reoviry a virus ptačí laryngotracheitidy. Zkoušky na adenoviry, reoviry a virus ptačí laryngotracheitidy jsou provedeny ve zkoušce na cizí antigeny při použití kuřat a jsou negativní.

Mykoplazmata (*2.6.7*). Vyhovuje zkoušce na mykoplazmata.

Bakterie a houby. Provede se kvantitativní zkouška na bakterie a houby. Vakcína obsahuje nejvýše jeden saprofytický mikroorganismus v dávce a je prostá patogenních mikroorganismů. Každá tekutina dodávaná s vakcínou vyhovuje zkoušce na sterilitu předepsané v článku *Vaccina ad usum veterinarium.*

Titr viru. Vakcína se titruje v buněčných kulturách nebo inokulací na chorioalantoidní membránu kuřecích embryí 9 až 11 dní starých. Jedna dávka vakcíny obsahuje nejméně takové množství viru, které odpovídá minimálnímu titru uvedenému v označení nebo v příbalovém letáku.

Stanovení účinnosti

Použijí se vnímavá kuřata z jednoho chovu prostého specifikovaných patogenů (*5.2.2*) nejnižšího stáří uvedeného v označení. Každému z nejméně dvaceti kuřat pro každý z udávaných způsobů podání se podá takový objem rekonstituované vakcíny, který obsahuje množství viru, jež odpovídá

minimálnímu titru uvedenému v označení nebo v příbalovém letáku. Jako kontrola se použije dvacet kuřat. Po 21 dnech se každé kuře čelenžuje intrafolikulárním podáním nebo skarifikací virulentním kmenem viru neštovic drůbeže. Kuřata se pozorují 21 dní. Vakcína vyhovuje zkoušce, jestliže na konci doby pozorování přežívá nejméně 90 % vakcinovaných kuřat a nejeví žádné příznaky onemocnění a všechny kontroly projevují příznaky onemocnění. Opomíjejí se přechodné místní reakce, které se objeví u vakcinovaných kuřat v průběhu 6 dní po čelenži.

Uchovávání

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*

Označování

Viz článek *Vaccina ad usum veterinarium.*
V označení na obalu se uvede stáří zvířat, ve kterém mají být vakcinována.

6.2.3 Radiofarmaceutické přípravky

Radiofarmaca

Radiofarmaka

Synonymum. Radiopharmaceutica

Ustanovení tohoto článku se vztahují na lékopisné články zabývající se radiofarmaky. Požadavky tohoto článku se nevztahují nutně na radiofarmaka, která lékopis neobsahuje.

Radiofarmaka jsou přípravky obsahující jeden nebo více radionuklidů.

Nuklid je druh atomu charakterizovaný počtem protonů a neutronů v jádře (tudíž jeho atomovým a hmotnostním číslem) a energetickým stavem jádra. Izotopy daného prvku jsou nuklidy se stejným atomovým číslem, ale s rozdílným číslem hmotnostním. Radionuklidy (radioaktivní nuklidy) se samovolně přeměňují na jiné nuklidy. Přeměna může být provázena emisí nabitých částic, elektronovým záchytem (EZ) nebo izomerním přechodem (IP). Nabité částice emitované z jádra mohou být částice alfa (jádra helia s hmotnostním číslem 4) nebo částice beta (elektrony se záporným nebo kladným nábojem, β^- nebo β^+, β^+ jsou známy jako pozitrony). Emise nabitých částic z jádra může být provázena zářením gama; toto záření je také emitováno při procesu izomerního přechodu. Emise záření gama může mít za následek vyražení elektronu z obalu atomu, prázdné místo se doplní elektronem z vyšší slupky, a to je doprovázeno emisí fotonu gama a následnou emisí rtg-paprsků. Tento jev je znám jako vnitřní konverze. Tato sekundární emise může být částečně nahrazena vyražením elektronů, známých jako Augerovy elektrony. Při kontaktu s hmotou dochází k anihilaci β^+ částic, která je doprovázena emisí záření gama o energii 511 keV.

Přeměna radionuklidů probíhá exponenciálně. Čas, za který se přemění polovina počáteční hodnoty radioaktivity, se nazývá poločas přeměny ($T_{1/2}$) a je charakteristický pro každý radionuklid.

Pronikavost každého záření se liší podle jeho druhu a energie. Částice alfa jsou zcela absorbovány vrstvou tuhých nebo kapalných látek o tloušťce od několika mikrometrů do několika desítek mikrometrů. Částice beta jsou zcela absorbovány vrstvou o tloušťce od několika milimetrů do několika centimetrů. Záření gama není úplně absorbováno, pouze zeslabeno a tloušťka vrstvy potřebná k desetinásobnému zeslabení může být např. až několik centimetrů olova. Čím je hustota absorbátoru vyšší, tím kratší je dosah částic alfa a beta a tím větší je zeslabení záření gama.

Každý radionuklid je charakterizován stálým poločasem přeměny, vyjádřeným v jednotkách času, a druhem a energií emitovaného záření. Energie je udávána v elektronvoltech (eV), kiloelektronvoltech (keV) nebo v megaelektronvoltech (MeV). Radioaktivita (aktivita) přípravku je počet jaderných přeměn za jednotku času.

Aktivita radionuklidu (množství radioaktivity) byla dříve vyjadřována v jednotkách curie (Ci), což je $3{,}7 \cdot 10^{10}$ přeměn za sekundu, dále milicurie, mikrocurie nebo nanocurie.

V mezinárodní soustavě jednotek (SI) se množství radioaktivity vyjadřuje v becquerelech (Bq), což je 1 jaderná přeměna za sekundu. Následné faktory umožňují převod mezi těmito dvěma systémy jednotek:

1 curie (Ci)	=	$3{,}7 \cdot 10^{10}$ becquerelů
	=	37 gigabecquerelů (GBq)
1 milicurie (mCi)	=	$3{,}7 \cdot 10^{7}$ becquerelů
	=	37 megabecquerelů (MBq)
1 mikrocurie (μCi)	=	$3{,}7 \cdot 10^{4}$ becquerelů
	=	37 kilobecquerelů (kBq)

1 gigabecquerel (GBq) = 27,027 milicurie (mCi)
1 megabecquerel (MBq) = 27,027 mikrocurie (μCi)
1 kilobecquerel (kBq) = 27,027 nanocurie (nCi)

Absolutní měření aktivity radionuklidu v daném vzorku může být provedeno úplně a přesně pouze tehdy, jsou-li známy druh a energie emitovaných záření a známe-li jejich relativní zastoupení. Toto měření vyžaduje specializovanou laboratoř. Identifikace a měření záření mohou být provedeny porovnávací a poměrovou metodou za použití referenčních přípravků (etalonů) poskytovaných národní laboratoří.

Základní pojmy

Radioaktivní zdroj (zářič). Radioaktivní materiál poskytující ionizující záření.

Uzavřený zářič. Radioaktivní zářič, při jehož použití radioaktivní materiál nepřijde do přímého styku s okolním prostředím. Skládá se z radioaktivního materiálu pevně zabudovaného v neaktivních tuhých látkách nebo je uzavřen do obalu z vhodného odolného materiálu, který zabraňuje pronikání radioaktivní látky a jakékoli možnosti kontaminace při obvyklém používání.

Otevřený zářič. Radioaktivní zářič, při jehož použití radioaktivní materiál přijde do přímého kontaktu s okolním prostředím. U otevřeného zářiče je radioaktivní materiál přímo přístupný. Předpokládá se, že tento materiál bude vystaven fyzikální nebo chemické manipulaci, během níž se může přenášet z jednoho obalu do druhého. Radiofarmaka patří k tomuto druhu zářičů.

Radionuklidová čistota. Poměr aktivity daného radionuklidu a celkové aktivity zářiče vyjádřený v procentech. K vyjádření tohoto poměru může být také používán termín "radioaktivní čistota" nebo "radioizotopová čistota".

Radiochemická čistota. Poměr aktivity daného radionuklidu přítomného v zářiči v určité chemické formě a celkové aktivity tohoto radionuklidu, vyjádřený v procentech.

Chemická čistota. Poměr hmotnosti látky přítomné v určité chemické formě a celkové hmotnosti látek obsažených v zářiči po vyloučení pomocných látek nebo rozpouštědel, vyjádřený v procentech.

Nosič. Stabilní izotop daného radionuklidu, který se přidává k radioaktivnímu přípravku ve stejné chemické formě, v jaké je přítomen radionuklid.

Měrná radioaktivita (měrná aktivita). Aktivita radionuklidu vztažená na jednotku hmotnosti daného prvku nebo jeho chemické formy. Například měrná aktivita fosforečnanu[^{32}P] sodného je vyjádřena následovně: 11,1 MBq fosforu-32 v miligramu fosforečnanového iontu, vztaženo k určenému datu a hodině.

Objemová aktivita (koncentrace radioaktivity). Aktivita radionuklidu vztažená na jednotku objemu roztoku, ve kterém je přítomen.

Zkoušky totožnosti

Radionuklid je určen svým poločasem přeměny nebo druhem a energií záření nebo oběma způsoby, jak je popsáno v článku.

Měření poločasu přeměny. Poločas přeměny se měří vhodným detekčním přístrojem, jako je ionizační komora, Geiger-Müllerův počítač nebo scintilační detektor. Radiofarmaka se měří jako taková, nebo po vhodném zředění rozpuštěné tobolky. Zvolená hodnota aktivity, se zřetelem na experimentální podmínky, musí být dostatečně vysoká, aby umožnila detekci během několika předpokládaných poločasů přeměny, ale neměla by být tak vysoká, aby se projevil jev "ztráty impulzů" v důsledku mrtvé doby Geiger-Müllerova počítače nebo náhodných koincidencí u scintilačního detektoru.

Radioaktivní zářič se připraví tak, aby se vyloučila ztráta materiálu během manipulace. Kapalina (roztok) se plní do ampulí nebo uzavřených zkumavek. Tuhá látka (případně zbytek po sušení v tobolce) se přikryje plátkem z přilnavého acetatu celulosy nebo z jiného materiálu, jehož hmotnost na jednotku plochy je dostatečně malá, aby významně neoslabovala sledované záření.

Stejný zářič se měří za shodných geometrických podmínek v intervalech, obvykle odpovídajících polovině poločasu přeměny, celkově po dobu rovnou asi třem poločasům přeměny. Správná funkce přístroje se kontroluje za použití zářiče s dlouhým poločasem přeměny, a je-li to třeba, provede se korekce odchylek (viz Stanovení radioaktivity).

Do grafu se vynese časová závislost logaritmu počtu impulzů za jednotku času (četnosti) nebo časová závislost elektrického proudu, podle typu použitého přístroje. Vypočtený poločas přeměny by se neměl lišit o více než 5 % od poločasu přeměny udaného v lékopise.

Křivka exponenciální přeměny (rozpadová křivka) je popsána rovnicí:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} ,$$

v níž značí:

A_t - aktivitu v čase t,

A_o - aktivitu v čase t = 0,

λ - přeměnovou konstantu charakteristickou pro každý radionuklid,

e - základ přirozených logaritmů.

Poločas přeměny ($T_{1/2}$) souvisí s přeměnovou konstantou λ podle vztahu:

$$T_{1/2} = \frac{0{,}693}{\lambda} .$$

Aktivita přípravku se měří v určitém čase. Aktivita v jiném čase se může vypočítat z exponenciální rovnice, stanovit z tabulek nebo se může určit z grafu vyneseného pro každý radionuklid.

Stanovení druhu a energie záření. Druh a energie emitovaného záření mohou být stanoveny několika způsoby, např. použitím spektrometrie nebo sestavením křivky zeslabení. Pro analýzu záření beta se obvykle používá sestavení křivky zeslabení; pro stanovení záření gama se většinou používá spektrometrie.

Křivka zeslabení se vynáší: pro čisté zářiče beta v případě, že není možné použít spektrometr pro záření beta; pro smíšené zářiče beta a gama v případě, že není možné použít spektrometr pro záření gama. Tato metoda odhadu maximální energie záření beta poskytuje pouze přibližnou hodnotu. Předpokladem správného měření je dodržení konstantních geometrických podmínek. Zářič se umístí před tenké okénko Geiger-Müllerova počítače nebo proporcionálního detektoru. Zářič je chráněn tak, jak je popsáno výše. Při měření četnosti impulzů zářiče je mezi ním a počítačem umísťováno postupně minimálně šest hliníkových fólií (stínítek) s postupně se zvyšující hmotností na jednotku plochy. S nejsilnější fólií se měří konstantní četnost impulzů. U čistých zářičů beta není četnost impulzů ovlivňována přidáním dalších fólií. Fólie se vkládají takovým způsobem, aby byly dodrženy konstantní geometrické podmínky. Vynese se závislost logaritmu četnosti impulzů na hmotnosti na jednotku plochy (mg/cm^2) pro každou fólii. Stejným způsobem je graf vynesen pro referenční přípravky. Výsledek je stanoven na základě střední části křivky, která je prakticky lineární.

Hmotnostní součinitel zeslabení (μ_m) závisí na energii záření beta a na fyzikálních a chemických vlastnostech fólie. Vyjadřuje se ve čtverečních centimetrech na miligram (cm^2/mg). Vypočítá se z grafu popsaného výše podle vztahu:

$$\mu_m = \frac{2{,}303}{m_2 - m_1} (\log A_1 - \log A_2) ,$$

v němž značí:
m_1 - hmotnost na jednotku plochy nejtenčí fólie,
m_2 - hmotnost na jednotku plochy nejsilnější fólie,
m_1 a m_2 se nacházejí v lineární části křivky zeslabení,
A_1 - četnost impulzů odpovídající m_1,
A_2 - četnost impulzů odpovídající m_2.

Takto vypočítaný hmotnostní součinitel zeslabení μ_m se neliší o více než 10 % od součinitele zeslabení referenčního přípravku stejného radionuklidu, který byl měřen za stejných podmínek.

Gama spektrometrie je založena na schopnosti některých látek (scintilátorů) emitovat světelné záření po dopadu záření gama. Počet vyslaných světelných fotonů je úměrný energii absorbované ve scintilátoru. Světelné záření je pak převedeno na elektrické impulzy s výškou (amplitudou) přibližně úměrnou energii, kterou fotony gama ztratily ve scintilátoru. Vyhodnocení výchozích impulzů vhodným amplitudovým analyzátorem poskytuje scintilační energetické spektrum zářiče. Scintilační spektra záření gama vykazují jeden nebo více charakteristických píků odpovídajících energiím záření gama daného zářiče. Tyto píky jsou doprovázeny dalšími píky různých šířek, které vznikly vlivem sekundárních účinků záření na scintilátor nebo na okolní materiál. Tvar získaného spektra závisí na použitém přístroji a geometrickém uspořádání zdroje a detektoru; přístroj je nezbytně nutné kalibrovat pomocí referenčního zářiče sledovaného radionuklidu.

Výhodnějším detektorem pro gama spektrometrii je polovodičový lithium-germaniový detektor. Tyto přístroje mohou mít energetické rozlišení (plná šířka píku v polovině maxima výšky) 2,0 keV až 2,5 keV při energii 1,3 MeV, a lze tedy identifikovat píky vzdálené od sebe 5 keV. Naproti tomu scintilační spektrometr s krystalem NaI(Tl) má podstatně horší energetické rozlišení (asi 50 keV). Výstup z těchto spektrometrů je představován elektrickými impulzy, jejichž amplituda odpovídá energii zaznamenaného záření gama. Analýza impulzů po jejich zesílení se provádí mnohakanálovým analyzátorem, který zobrazuje spektrum daného zářiče gama. Vztah mezi energií gama a počtem a číslem kanálu může být jednoduše stanoven pomocí zářiče emitujícího záření gama o známé energii.

Detekční systém musí být kalibrován, neboť detekční účinnost je funkcí energie záření gama a závisí na druhu zářiče a na vzdálenosti detektoru od zářiče. Detekční účinnost může být změřena za použití kalibrovaného vzorku sledovaného radionuklidu. Většinou se však používá graf detekční účinnosti v závislosti na energii záření gama, který se sestaví ze série kalibrovaných zářičů různých radionuklidů.

Spektrum záření gama radionuklidu, který emituje pouze záření gama, je charakteristické pro každý radionuklid; je vytvořeno fotony určitých energií emitovaných s daným zastoupením (počtem fotonů na 100 přeměn radionuklidu). Tato vlastnost může být využívána ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení radionuklidů obsažených v zářiči a usnadňuje stanovení stupně radionuklidové čistoty detekcí píků jiných radionuklidů, než které jsou očekávány.

Amplituda píků ve scintilačním nebo polovodičovém spektru zářiče klesá s jeho poločasem přeměny. Je-li v zářiči přítomna radioaktivní nečistota s delším poločasem přeměny, lze ji zaznamenat na základě charakteristických píků, jejichž amplituda se snižuje s rozdílným poločasem přeměny, než je poločas přeměny sledovaného radionuklidu. Nečistotu lze identifikovat vyhodnocením poločasu přeměny interferujících píků.

Tabulka (uvedená níže) ukazuje všeobecně uznávané fyzikální charakteristiky radionuklidů používaných přípravků, které jsou uvedeny v lékopise. V tabulce jsou navíc uvedeny i fyzikální charakteristiky hlavních nečistot radionuklidů.

Stanovení radioaktivity

Absolutní měření radioaktivity daného vzorku je možné jen v případě, že je známo přeměnové schéma nuklidu. Je obvykle založeno na koincidenční metodě, při níž např. záření beta a záření gama jsou zaznamenány odděleně i současně (v koincidenci) speciálními přístroji. Četnosti zaznamenané odděleně a četnosti zaznamenané v koincidenci postačují pro stanovení účinnosti a počtu přeměn radionuklidu za jednotku času (aktivity radionuklidu). V praxi je třeba mnoho korekcí pro dosažení správného výsledku.

Relativní měření aktivity radionuklidu se provádí obvykle porovnáním s referenčním zářičem za použití Geiger-Müllerova počítače, proporcionálního počítače, scintilačního detektoru nebo ionizační komory. Geiger-Müllerův počítač se používá k měření zářičů beta a beta-gama; scintilační a polovodičové detektory se používají k měření záření gama; zářiče beta s nízkou energií vyžadují kapalné scintilační detektory.

Při použití kteréhokoli přístroje je nezbytné pracovat za přesně definovaných geometrických podmínek tak, aby radioaktivní zářič byl vždy umístěn v přístroji ve stejné poloze, tj. že jeho vzdálenost od měřicího zařízení je konstantní a zůstává stejná i při měření referenčního přípravku. Roztoky radiofarmak mohou být měřeny např. v ionizačních komorách nebo na scintilačních detektorech se studnovým krystalem. Pro určité typy přístrojů, jako je Geiger-Müllerův počítač s koncovým okénkem nebo scintilační detektor s plošným krystalem, je však vhodnější používat odparku. Doporučuje se suchý odparek přikrýt proužkem přilnavého acetatu celulosy, jehož hmotnost na jednotku plochy by měla být menší než 10 mg/cm^2, takže absorpce záření je zanedbatelná. Odparek referenčního přípravku by měl být pokud možno shodný s odparkem zkoušeného roztoku, tj. oba roztoky by měly obsahovat stejné substance o stejné koncentraci a odpařování by se mělo provádět za stejných podmínek, na povrchu ze stejného materiálu a na stejné ploše. Při dodržení těchto předpisů jsou dosažené výsledky vyhovující při použití kteréhokoli měřicího přístroje. Je nezbytné, aby účinnost měřicího přístroje byla konstantní během doby měření; kontroluje se měřením sekundárního zářiče obsahujícího radionuklid s dlouhým poločasem přeměny.

Nízkoenergetické zářiče beta se měří detektory s kapalnými scintilátory. Vzorek se rozpustí v roztoku obsahujícím jednu nebo více, často dvě organické fluorescenční látky (primární a sekundární scintilátory). Část kinetické energie ionizujícího záření je převáděna na fotony viditelného záření, které jsou snímány fotonásobičem a převáděny na elektrické impulzy. Při použití detektoru s kapalným scintilátorem by měla být provedena korekce na zhášecí efekt.

Při měření aktivity radionuklidů musí být zajištěno, aby geometrické podmínky pro měřený zářič i pro referenční zářič byly totožné (stejné objemy nádob i roztoků). Výsledky všech měření se korigují na pozadí detekčního přístroje způsobeném přirozenou radioaktivitou prostředí a falešnými impulzy vznikajícími v samotném detekčním zařízení.

Při měření radionuklidů o vysokých aktivitách některými přístroji je třeba korigovat výsledky na ztrátu četnosti impulzů v důsledku časového rozlišení (mrtvé doby) detekčního zařízení a připojeného elektronického zařízení. Pro detekční systém s danou mrtvou dobou τ platí vztah:

$$N = \frac{N_0}{1 - N_0\tau} ,$$

v němž značí:

N - skutečnou četnost impulzů za sekundu,

N_0 - změřenou četnost impulzů za sekundu,

τ - mrtvou dobu v sekundách.

Je zřejmé, že takováto korekce bude přijatelně malá pouze v případě, že bude mít součin $N_0\tau$ nízkou hodnotu. U některých přístrojů je tato korekce prováděna automaticky. Korekce četnosti na mrtvou dobu se provádí dříve než korekce na pozadí.

Výsledky stanovení radioaktivity vykazují odchylky, které pocházejí hlavně z náhodné povahy jaderných přeměn. Pro kompenzaci odchylek v počtu přeměn na jednotku času musí být zaznamenán dostatečný počet impulzů. K dosažení směrodatné odchylky menší než 1 % je třeba minimálně 10 000 impulzů. Všechny údaje o obsahu radioaktivity by měly být provázeny údaji o datu, příp. hodině, kdy bylo měření provedeno. Při měření radioaktivity rozpuštěného vzorku se radioaktivita přepočítává na původní objem roztoku a vztahuje se na jednotku objemu, aby vyjadřovala objemovou aktivitu (koncentraci radioaktivity).

Radionuklidová čistota

Radionuklidová čistota přípravku, a tudíž totožnost každého přítomného radionuklidu musí být známá. Všeobecně nejpoužívanější metodou zkoušky na radionuklidovou čistotu je gama spektrometrie. Není to úplně spolehlivá metoda, protože nečistoty emitující záření beta nejsou obvykle detegovatelné. Použijí-li se NaI detektory, jsou píky nečistot často překryty spektrem hlavního radionuklidu.

Jednotlivé články předpisují požadavky na radionuklidovou čistotu (např. spektrum gama by se nemělo výrazně lišit od spektra referenčního přípravku) a mohou udávat limity pro určité radionuklidové nečistoty (např. kobalt-60 v kobaltu-57). Ačkoli tyto požadavky jsou nezbytné, samy o sobě nezaručují, že radionuklidová čistota přípravku je vhodná pro humánní použití. Výrobce musí provádět podrobné zkoušení svých výrobků, zvláště u přípravků radionuklidů s krátkým poločasem přeměny a dostatečně odeznělou aktivitou, na nečistoty s dlouhým poločasem přeměny. Touto cestou se získávají informace o vhodnosti jednotlivého výrobního procesu a správnosti jeho zkušebních postupů.

Radiochemická čistota

Stanovení radiochemické čistoty spočívá v oddělení různých chemických látek obsahujících radionuklid a v odhadu radioaktivity spojené s deklarovanými chemickými látkami. Ke stanovení radiochemické čistoty může být použita jakákoliv analytická separace, avšak s přihlédnutím k rychlosti a jednoduchosti se stala nejvhodnější chromatografie na plošných nosičích (papír nebo tenká vrstva) a pro určité přípravky elektroforéza (papír nebo vrstva acetatu celulosy). U technických popisů těchto analytických metod, obsažených v lékopise, musí být uvedeny speciální bezpečnostní předpisy pro práci s radioaktivními látkami.

Jak je uvedeno v obecných statích pro chromatografii, objem naneseného vzorku na start má být nejvýše 10 µl. Je vhodné neředit zkoušený přípravek, ale je důležité nanést takové množství radioaktivity, při němž ještě nedochází ke ztrátě četnosti impulzů v důsledku mrtvé doby přístroje. Při stanovení velmi malého množství radioaktivních látek se může přidat nosič, pokud je to uvedeno v jednotlivých článcích. Po vyvinutí se vrstva (chromatogram) usuší a poloha radioaktivních ploch se deteguje měřením radioaktivity podél celého chromatogramu za použití vhodného kolimátoru nebo nastříháním proužků a měřením jednotlivých částí chromatogramu. Poloha skvrn nebo ploch se může stanovit i porovnáním s neradioaktivními roztoky o stejném chemickém složení vizuálně pomocí barevných reakcí nebo hodnocením v ultrafialovém světle. Přímé barevné reakce nejsou vždy možné nebo žádoucí, protože postřik zvýrazňujícími látkami může způsobit difuzi radioaktivních látek mimo skvrnu či plochu.

Aktivitu lze měřit za použití integrátoru a zapisovače nebo digitálního počítače. Poměry ploch píků jsou úměrné poměrům radioaktivních koncentrací chemických látek. Pokud jsou chromatogramy nastříhány na jednotlivé části, poměry množství změřené radioaktivity jsou úměrné příslušné chemické formě radioaktivních látek.

Měrná radioaktivita

Měrná aktivita se obvykle počítá z objemové aktivity (koncentrace radioaktivity) a z koncentrace sledované chemické látky. Nejprve je však třeba ověřit, že radioaktivita odpovídá pouze danému radionuklidu (radionuklidová čistota) a dané chemické látce (radiochemická čistota).

Sterilita

Radiofarmaka určená pro parenterální podávání musí být připravena podle předpisů vylučujících mikrobiální znečištění a zaručujících sterilitu. Zkouška sterility se provádí podle předpisu uvedeného v obecné stati *(2.6.1)*. U radiofarmak vznikají určité problémy v důsledku malých velikostí šarží a nebezpečí ozáření. Před vydáním povolení k použití určité šarže není vždy možné čekat na výsledky zkoušky sterility a zkoušku potom tvoří kontrola kvality výroby.

Přestože v článku *Parenteralia* jsou požadavky na použití protimikrobních přísad, jejich přídavek k radiofarmakům určeným k opakovanému podávání není závazný, pokud to není předepsáno v článku.

Pyrogenní látky

Pro určité přípravky je zkouška na pyrogenní látky předepsána, ale protože radionuklidy přítomné v přípravku mají obvykle krátký poločas přeměny a dost vysokou radioaktivitu, je obtížné provést zkoušku na pyrogenní látky před vydáním povolení k použití šarže. Aby se zabránilo hypertermii, která může být způsobená ne pyrogenními látkami, ale radioaktivitou přípravku, je někdy nutné počkat, až radioaktivita klesne na hodnotu předepsanou v článku a je taková, že může být podán předepsaný objem radioaktivního roztoku. Nehledě na tyto detaily se zkouška provádí v souladu s obecnou statí (*2.6.8*), při dodržení nezbytných předpisů radiační ochrany pracovníků provádějících zkoušku; zkouška je součástí kontroly kvality výroby. Výrobci se doporučuje předem si ověřit nepřítomnost pyrogenních látek ve výchozích látkách pro výrobu radiofarmak.

Předepsaná zkouška může být pro některá radiofarmaka nevhodná. Nemusí být například dostatečně citlivá pro přípravky podávané do páteřního kanálu nebo je nevhodná, jestliže se zkouška provádí po vydání povolení k použití. V těchto případech může být použita zkouška na bakteriální endotoxiny (*2.6.14*).

Uchovávání

Ve vzduchotěsných obalech na vhodně stíněném místě, aby pracovníci byli chráněni před primárním nebo sekundárním zářením, a které vyhovuje národním i mezinárodním předpisům týkajícím se uchovávání radioaktivních látek. Následkem ozařování mohou obaly a roztoky během uchovávání ztmavnout, toto ztmavnutí však nutně neznamená zhoršení kvality přípravků.

Radiofarmaka jsou určena k rychlé spotřebě.

Označování

V označení na obalu se uvede:
- název přípravku,
- jméno výrobce,
- identifikační číslo,
- pro kapalné přípravky: celková radioaktivita ve vnitřním obalu (lahvičce) nebo koncentrace radioaktivity v mililitru, vztažená k referenčnímu datu, a je-li třeba i k hodině, a objem kapaliny ve vnitřním obalu,
- pro tuhé přípravky, jako jsou lyofilizáty: celková radioaktivita vztažená k referenčnímu datu, a je-li třeba i k hodině,
- pro tobolky: radioaktivita každé tobolky vztažená k referenčnímu datu, a je-li třeba i k hodině, a počet tobolek v obalu,
- že přípravek je určen do rukou lékaře,
- způsob podávání,
- doba použitelnosti,
- název a koncentrace přidaných protimikrobních přísad,
- jakékoli zvláštní podmínky skladování.

Tabulka fyzikálních charakteristik radionuklidů obsažených v lékopise

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Cesium-137 [^{137}Cs] v rovnováze s baryem-137m [^{137m}Ba]	30,2 r (^{137m}Ba: 2,55 min)	e_A e_c β^-	0,004 0,026 0,624 0,656 0,660 0,511[a] 1,173[a]	7,8 0,8 8 1,4 0,4 94,6 5,2	rtg γ	0,005 0,032 - 0,037 0,661	1 7 85,4
Fosfor-32 [^{32}P]	14,3 d	β^-	1,71a	100			
Gallium-66 [^{66}Ga]	9,4 h	e_A β^+	0,001 0,008 0,361[a] 0,720 - 0,820[a] 0,924[a] 1,780[a] 4,153[a]	56 21 1 1,1 4,1 0,4 50	rtg γ	0,001 0,008 - 0,010 0,511 0,834 1,039 1,333 1,918 2,190 2,422 2,752 4,295	0,3 19 113[b] 6 38 1,3 2,2 5,8 2 23,5 3,5
Gallium-67 [^{67}Ga]	3,26 d	e_A e_c	0,001 0,007 - 0,010 0,081 - 0,084 0,090 - 0,093 0,175	169 60 27 6 0,4	rtg γ	0,001 0,008 - 0,010 0,091 - 0,093 0,185 0,209 0,300 0,394 0,494 0,888	1 55 38,5 22 2,4 16,5 4,5 0,09 0,4
Chrom-51 [^{51}Cr]	27,7 d	e_A	0,0004 0,004	144 67	rtg γ	0,0005 0,005 0,320	0,33 22,3 9,83
Indium-111 [^{111}In]	2,8 d	e_A e_c	0,002 - 0,004 0,018 - 0,027 0,145 0,167 - 0,171 0,219 0,241 - 0,245	101 16 7,9 1,2 4,9 0,9	rtg γ	0,003 - 0,004 0,023 - 0,028 0,171 0,245	6,3 82,4 90,9 94,2

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Indium-114m [^{114m}In]	49,5 d	e_A, a_c β^-	1,99	95	rtg	0,023 - 0,028	40
Indium-114 [^{114}In]	(^{114}In: 72 s)				γ	0,190 0,558 0,725	17,7 4,6 4,6
Jod-123 [^{123}I]	13,2 h	e	$_A$0,002 - 0,005 0,021 - 0,031 0,127 0,154 0,158	98 12 13,6 1,8 0,4	rtg γ	0,003 - 0,005 0,027 - 0,032 0,159 0,346 0,440 0,505 0,529 0,538	8 87 83,4 0,1 0,4 0,3 1,4 0,4
Jod-124 [^{124}I]	4,2 d	e e_c β^+	$_A$ 0,003 0,023 0,571 0,810 1,532 2,135	64 8 0,3 0,3 11,3 11,3	rtg γ	0,004 0,027 - 0,031 0,511 0,606 0,723 1,325 1,376 1,509 1,691	6 59 46[b] 61 10 1,5 1,7 3 10,5
Jod-125 [^{125}I]	60,1 d	e + e $_A$	0,002 - 0,005 0,021 - 0,035	236 33	rtg γ	0,003 - 0,005 0,027 0,031 0,035	15 114 25 6,7
Jod-126 [^{126}I]	13,0 d	e e_c β^- β^+	$_A$ 0,003 0,022 0,354 0,634 0,371[a] 0,862[a] 1,251[a] 1,134[a]	43,5 5,7 0,5 0,1 3,6 32 8 3,3	rtg γ	0,004 0,027 - 0,031 0,388 0,491 0,511 0,666 0,754 0,880 1,420	4,3 40 34 2,9 6,7[b] 33 4,2 0,8 0,3

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Jod-131 [^{131}I]	8,04 d	e e_c β^-	$_A$ 0,003 0,025 0,045 0,075 - 0,079 0,250 0,330 1,359 0,248[a] 0,304[a] 0,334[a] 0,606[a] 0,807[a]	5,1 0,6 3,5 0,6 0,25 1,5 0,25 2,1 0,6 7,4 89,4 0,4	rtg γ	0,004 0,029 - 0,034 0,080 0,284 0,365 0,637 0,722	0,6 5 2,6 6,1 81,2 7,3 1,8
Kobalt-57 [^{57}Co]	271 d	e $e_A + e_c$ e_c	$_A$ 0,0007 0,005 - 0,007 0,014 0,115 0,129	249 175 8,9 1,9 1,4	rtg γ	0,0007 0,007 0,014 0,122 0,136 0,692	0,8 56 9,5 85,6 10,6 0,16
Kobalt-58 [^{58}Co]	70,8 d	e β^+	$_A$ 0,0007 0,006 0,475[a]	117 49,4 15	rtg γ	0,0007 0,006 0,511 0,811 0,864 1,675	0,4 26,2 30[b] 99,4 0,7 0,5
Kobalt-60 [^{60}Co]	5,27 r	β	$_-$ 0,318[a]	99,9	γ	1,173 1,332	99,9 100
Krypton-85 [^{85}Kr]	10,7 r	β	$_-$ 0,173[a] 0,687[a]	0,43 99,57	γ	0,514	0,43
Molybden-99 [^{99}Mo] v rovnováze s techneciem-99m [^{99m}Tc]	66,0 h	$e_c + e_A$ e_c β^-	0,002 0,015 - 0,020 0,119 - 0,121 0,137 - 0,140 0,436[a] 0,848[a] 1,214[a]	110 7 9,5 1,5 16,6 1,2 82	rtg γ	0,002 0,018 - 0,021 0,140 0,181 0,366 0,740 0,778 0,823	0,7 14 91 6 1,2 12,3 4,4 0,13

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Olovo-201 [^{201}Pb]	9,4 h	e_A, e_c	(*)	(*)	rtg γ	0,070 - 0,073 0,083 0,130 0,331 0,361 0,406 0,585 0,692 0,767 0,826 0,908 0,946	68 19 1,3 79 9,9 2,0 3,5 2,7 3,3 2,3 6 7,5
Olovo-203 [^{203}Pb]	2,17 d	e_A e_c	0,008 0,055 0,194 0,316	54 3 13 0,5	rtg γ	0,010 0,070 - 0,073 0,083 0,279 0,401 0,681	36 68 19 80 3,4 0,7
Rtuť-197m [^{197m}Hg]	23,8 h	e_A $e_A + e_c$ e_c	0,005 - 0,014 0,050 - 0,080 0,116 - 0,130 0,150 0,161 0,198	75 36 50 51 21 1,6	rtg γ	0,008 - 0,015 0,067 - 0,083 0,130 0,134 0,164 0,279	44 40,5 0,23 34 0,32 5,1
Rtuť-197 [^{197}Hg]	64,1 d	e_A $e_A + e_c$	0,005 - 0,014 0,050 - 0,080	91 84	rtg γ	0,008 - 0,017 0,067 - 0,080 0,077 0,191 0,269	52 73 18,9 0,57 0,05
Rtuť-203 [^{203}Hg]	46,8 d	e_A e_c β^-	0,005 - 0,015 0,055 - 0,085 0,194 0,264 0,276 0,212[a]	9,3 0,44 13,4 3,9 1,2 100	rtg γ	0,009 - 0,015 0,071 - 0,085 0,279	5,4 13 81,4

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Ruthenium-103 [^{103}Ru] v rovnováze s rhodiem-103m [^{103m}Rh]	39,3 d (^{103m}Rh: 56,1 min)	e_A $e_A + e_c$ e_c β^-	0,002 0,017 0,036 - 0,039 0,112 0,225 0,722	77 11 91 6,4 87 6	rtg γ	0,003 0,020 - 0,023 0,053 0,295 0,444 0,497 0,557 0,610	4 7,7 0,4 0,3 0,4 89,7 0,8 5,6
Selen-75 [^{75}Se]	118,5 d	e_A e_c	0,001 0,009 0,013 0,023 0,054 0,085 0,095 0,109 0,124 0,134 0,253 0,268	136 44 4,3 1,0 0,4 2,7 0,4 0,7 1,6 0,2 0,4 0,2	rtg γ	0,001 0,011 0,066 0,097 0,121 0,136 0,199 0,265 0,280 0,304 0,401	1 57 1 3,5 17,7 61 1,5 59,4 25,2 1,3 11,3
Stroncium-89 [^{89}Sr]	50,5 d	β^-	1,492[a]	100			
Stroncium-90 [^{90}Sr]	29,1 r	β^-	0,546[a]	100			
Stroncium-90/Yttrium-90 [^{90}Sr/^{90}Y]	29,1 r (^{90}Y: 64,0 h)	β^-	0,546[a] 2,284[a]	100 100			
Technecium-99m [^{99m}Tc]	6,02 h	$e_c + e_A$ e_A	0,002 0,015 - 0,020 0,119 - 0,121 0,137 - 0,140	110 2,1 9,5 1,5	rtg γ	0,002 0,018 - 0,021 0,140	0,5 7,2 89,3
Technecium-99 [^{99}Tc]	2,14 . 10^5 r	β^-	0,29[a]	100			

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Thallium-200 [^{200}Tl]	1,09 d	e	$_A$ (*)	(*)	rtg γ	0,069 - 0,070 0,080 - 0,083 0,368 0,579 0,661 0,828 0,886 1,206 1,226 1,274 1,363 1,515	66 19 88,4 14 2,3 11 2 30,0 3,4 3,3 3,5 4,1
Thallium-201 [^{201}Tl]	3,05 d	e e_c $e_A + e_c$ e_c	$_A$0,005 - 0,015 0,015 - 0,020 0,027 - 0,032 0,052 - 0,085 0,120 - 0,123 0,132 - 0,135 0,153 - 0,155 0,164 - 0,167	77 19 6,4 27,8 1,3 0,4 2,8 0,8	rtg γ rtg γ	0,008 - 0,015 0,031 - 0,032 0,069 - 0,071 0,079 - 0,083 0,135 0,166 - 0,167	45 0,6 75 21 2,8 10,7
Thallium-202 [^{202}Tl]	12,2 d	e	$_A$ (*)	(*)	rtg γ	0,069 - 0,071 0,080 - 0,083 0,440	65 19 95
Tritium [^{3}H]	12,3 r	β	$^-$ 0,019[a]	100			
Xenon-131m [^{131m}Xe	11,9 d	e , e	$_A$ $_c$ 0,003 0,025 0,129 0,158 0,163	26 6,8 61 28,6 8,2	rtg γ	0,004 0,029 - 0,034 0,164	3 54 1,92
Xenon-133 [^{133}Xe]	5,29 d	e e_c β	$_A$ 0,004 0,025 0,045 0,075 0,266[a] 0,346[a]	50 6 52 8,5 0,7 99,3	rtg γ	0,004 0,030 - 0,035 0,081	6 47 37
Xenon-133m [^{133m}Xe]	2,19 d	e e_c	$_A$ 0,004 0,025 0,198 0,228 0,232	70 7,1 64 21 5	rtg γ	0,004 0,030 - 0,035 0,233	8 57 10,3

Radionuklid	Poločas přeměny r - rok d - den	Emise elektronů			Emise fotonů		
		druh	energie (MeV)	počet částic na 100 přeměn	druh	energie (MeV)	počet fotonů na 100 přeměn
Zinek-65 [^{65}Zn]	243,9 d	e_A β^+	0,001 0,007 - 0,010 0,330[a]	127 48 1,46	rtg γ	0,001 0,008 - 0,010 0,511 1,115	0,8 38,7 2,92[b] 50,75
Zlato-198 [^{198}Au]	2,70 d	e_A e_c β^-	0,005 - 0,015 0,329 0,397 0,408 0,290[a] 0,966[a]	2,1 2,9 1 0,34 1 98,9	rtg γ	0,008 - 0,015 0,069 - 0,083 0,412 0,676 1,088	1,3 2,8 95,6 0,8 0,2
Zlato-199 [^{199}Au]	3,14 d	e_A $e_A + e_c$ e_c β^-	0,005 - 0,015 0,035 - 0,054 0,075 0,125 0,144 0,155 - 0,158 0,193 0,245[a] 0,294[a] 0,435[a]	21 4,1 10,5 5,5 17,1 5,8 2 18,9 66,4 14,7	rtg γ rtg γ	0,008 - 0,015 0,050 0,068 - 0,080 0,158 0,208	12,8 0,33 15,4 36,9 8,4

[a] maximální energie částic beta
[b] maximální počet fotonů na 100 přeměn odpovídající úplné anihilaci ve zdroji
e_A Augerovy elektrony
e_c konverzní elektrony
(*) Přesné hodnoty nejsou dosud známy.

Aquae tritiatae[^{3}H] solutio iniectabilis

Injekce s tritiovanou[^{3}H] vodou

Je to voda na injekci, ve které některé molekuly vody obsahují atom tritia na místě vodíkového atomu. Přípravek může být izotonizován přídavkem chloridu sodného. Tritium[^{3}H] se může získat ozařováním lithia neutrony. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity tritia k referenčnímu datu uvedenému v označení.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina.
Tritium má poločas přeměny 12,3 roku a emituje záření beta.

Zkoušky totožnosti

Zaznamená se spektrum záření beta způsobem uvedeným ve zkoušce Radionuklidová čistota. Spektrum zkoušeného přípravku se významně neliší od spektra referenčního přípravku tritiované[^{3}H] vody. Referenční přípravek tritiované[^{3}H] vody se získává od národní laboratoře. Maximum energie záření beta je při 0,019 MeV.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,5 až 7,0.

Radionuklidová čistota.

A. 100 µl vhodně zředěného zkoušeného přípravku se smíchá s 10 ml scintilačního roztoku obsahujícího 1000 ml *dioxanu R*, 100 g *naftalenu R*, 7 g *difenyloxazolu R* a 0,3 g *methylfenyloxazolylbenzenu R*. Použijí se zkoumadla analytické čistoty vhodná pro kapalinovou scintilační spektrometrii. Změří se radioaktivita směsi na kapalně scintilačním spektrometru s diskriminátorem. Při nejnižším nastavení diskriminátoru je četnost asi 5000 impulzů/min. Změří se počet impulzů při různých nastaveních diskriminátoru. Při každém měření se vezme minimálně 10 000 impulzů v časovém intervalu nejméně 1 min. Za stejných podmínek se ihned změří referenční přípravek tritiované[^{3}H] vody, který má přibližně stejnou radioaktivitu.

Na semilogaritmický papír se vynese počet impulzů (upravený na pozadí) proti nastavení diskriminátoru. Vertikální vzdálenost křivky zkoušené látky a křivky referenčního přípravku je konstantní a odpovídá matematickému vztahu:

$$\frac{\frac{A_1}{B_1} - \frac{A_2}{B_2}}{\frac{A_1}{B_1}} \cdot 100 < 20,$$

v němž značí:
A_1 - aktivitu referenčního přípravku při nejnižším nastavení diskriminátoru,
B_1 - aktivitu zkoušeného přípravku při nejnižším nastavení diskriminátoru,
A_2 - aktivitu referenčního přípravku při nastavení diskriminátoru $A_2 \approx A_1 \cdot 10^{-3}$,
B_2 - aktivitu zkoušeného přípravku při stejném nastavení diskriminátoru.

B. Změří se spektrum gama. Přístroj zaznamená pouze radioaktivitu pozadí.

Radiochemická čistota. Do skleněné aparatury pro stanovení destilačního rozmezí *(2.2.11)* se umístí množství zkoušeného přípravku odpovídající asi 74 kBq zředěné *vodou R* na 50 ml. Stanoví se radioaktivní koncentrace způsobem popsaným v článku *Radiofarmaca*. Destiluje se do získání asi 25 ml destilátu. Vhodným bezpečnostním opatřením je třeba zabránit kontaminaci vzduchu. Je-li zkouška prováděna v digestoři, musí se chránit před průvanem. Stanoví se radioaktivní koncentrace destilátu a kapaliny zbylé v destilační nádobě. Hodnota radioaktivní koncentrace změřená po destilaci se neliší o více než 5 % od hodnoty radioaktivní koncentrace změřené před destilací.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.*

Stanovení radioaktivity

Stanoví se kapalinovou scintilační spektrometrií způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Chromii[^{51}Cr] edetatis solutio iniectabilis

Injekce s edetanem chromu[^{51}Cr]

Je to sterilní roztok obsahující chrom-51 ve formě komplexu chromu (III) s kyselinou ethylendiamintetraoctovou, která je v přebytku. Může být izotonizován přídavkem chloridu sodného a může obsahovat vhodné protimikrobní přísady, jako je benzylalkohol. Chrom-51 je radioaktivní izotop chromu, který může být připraven ozařováním chromu přírodního izotopového složení nebo obohaceného chromem-50 neutrony. Obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity chromu-51 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá chromu-51 ve formě edetanu chromu. Přípravek obsahuje proměnlivé množství chromu (Cr) nepřevyšující 1 mg v mililitru.

Vlastnosti

Čirý fialový roztok.
Chrom-51 má poločas přeměny 27,7 dne a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku chromu-51. Referenční roztok chromu-51 se získává od národní laboratoře. Fotony gama mají energii 0,320 MeV.

B. Hodnotí se elektroforeogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 6,5.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku chromu-51.

Radiochemická čistota. Stanoví se zónovou elekroforézou *(2.2.31)* za použití papírového pruhu jako nosiče (vhodný použitý papír má hmotnost 120 g/m^2, tloušťku 0,22 mm a kapilární stoupání 105 mm až 115 mm/30 min). Jako elektrolyt se použije roztok obsahující *barbital sodnou sůl R* (0,2 g/l) a *dusičnan sodný R* (10 g/l).

Na papír se nanese 10 µl zkoušeného přípravku do 3mm proužku ve vzdálenosti 10 cm od katody. Pod stabilizovaným proudem s elektrickým polem asi 30 V/cm se vyvíjí po dobu 30 min. Edetan chromu[^{51}Cr] se posune asi 5 cm k anodě, chroman[^{51}Cr] se posune asi 10 cm k anodě a chromitý[^{51}Cr] iont se posune asi 7 cm ke katodě. Vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Nejméně 95 % celkové radioaktivity je v proužku odpovídajícím edetanu chromu[^{51}Cr].

Chrom. Připraví se porovnávací roztok chromu (1 mg Cr/ml) takto: 0,96 g *síranu draselnochromitého R* a 2,87 g *edetanu disodného R* se rozpustí v 50 ml *vody R*, 10 min se povaří, ochladí se, pomocí *hydroxidu sodného zředěného RS* se upraví pH na hodnotu 3,5 až 6,5 a zředí se *vodou R* na 100,0 ml. Změří se absorbance *(2.2.25)* zkoušeného přípravku a porovnávacího roztoku při 560 nm. Hodnota absorbance zkoušeného přípravku nepřevyšuje absorbanci porovnávacího roztoku.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem chromu-51 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Cyanocobalamini[^{57}Co] capsulae

Tobolka s kyanokobalaminem[^{57}Co]

Je to tobolka obsahující kyanid [^{57}Co]-α-(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamidu. Může obsahovat vhodné pomocné látky. Kobalt-57 je radioaktivní izotop kobaltu, který může být vyroben ozařováním niklu protony o vhodné energii. Kyanokobalamin[^{57}Co] může být připraven růstem vhodných mikroorganismů v prostředí obsahujícím [^{57}Co]kobaltový iont. Nejméně 90 % kobaltu-57 je ve formě kyanokobalaminu. Tobolky vyhovují požadavkům na tvrdé tobolky uvedeným v článku *Capsulae,* pokud není uvedeno a schváleno jinak.

Vlastnosti

Tvrdé želatinové tobolky.
Kobalt-57 má poločas přeměny 271 dní a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem popsaným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku kobaltu-57. Referenční roztok kobaltu-57 a referenční roztok kobaltu-58 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama kobaltu-57 mají energii 0,122 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Retenční čas hlavního píku na radiochromatogramu zkoušeného roztoku se prakticky shoduje s retenčním časem píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem popsaným v článku *Radiofarmaca* za použití vhodného zařízení kalibrovaného pomocí referenčních roztoků kobaltu-57 a kobaltu-58. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku kobaltu-57. Stanoví se relativní obsah kobaltu-57, kobaltu-56 a kobaltu-58. Kobalt-56 má poločas přeměny 78 dní a jeho přítomnost dokazují fotony gama o energii 0,847 MeV. Kobalt-58 má poločas přeměny 70,8 dne a jeho přítomnost dokazují fotony gama o energii 0,811 MeV. Z celkové radioaktivity připadá nejvýše 0,1 % na kobalt-56, kobalt-58 a další radionuklidové nečistoty.

Radiochemická čistota. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Obsah tobolky se rozpustí v 1,0 ml *vody R* a nechá se 10 min stát. Potom se centrifuguje 10 min při 2000 otáček/min a použije se vrchní tekutina.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyanokobalaminu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml. Použitelnost roztoku je 1 h.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (10 g/l) (26,5 + 73,5), jejíž pH bylo upravena na 3,5 *kyselinou fosforečnou R.* Průtoková rychlost je 1,0 ml/min. Směs lze použít do dvou dnů od přípravy,
- detektoru radioaktivity nastaveného na kobalt-57,
- spektrofotometrického detektoru při 361 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 100 μl každého roztoku. Zaznamená se chromatogram zkoušeného roztoku po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času kyanokobalaminu a z ploch píků se vypočítá procentuální obsah kobaltu-57 přítomného jako kyanokobalamin.

Chromatogram porovnávacího roztoku se zaznamenává po dobu 30 min.

Rozpadavost. Tobolky vyhovují zkoušce rozpadavosti tablet a tobolek *(2.9.1)* s tím rozdílem, že se použije pouze jedna tobolka místo šesti.

Obsahová stejnoměrnost. Měří se jednotlivě radioaktivita nejméně deseti tobolek za použití vhodného zařízení za stejných geometrických podmínek. Vypočítá se průměrná radioaktivita jedné tobolky. Radioaktivita žádné tobolky se neliší od nalezené průměrné radioaktivity o více než ±10 %. Relativní směrodatná odchylka je menší než 3,5 %.

Stanovení radioaktivity

Průměrná radioaktivita zjištěná ve zkoušce Obsahová stejnoměrnost je 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity kobaltu-57 k referenčnímu datu uvedenému v označení.

Uchovávání

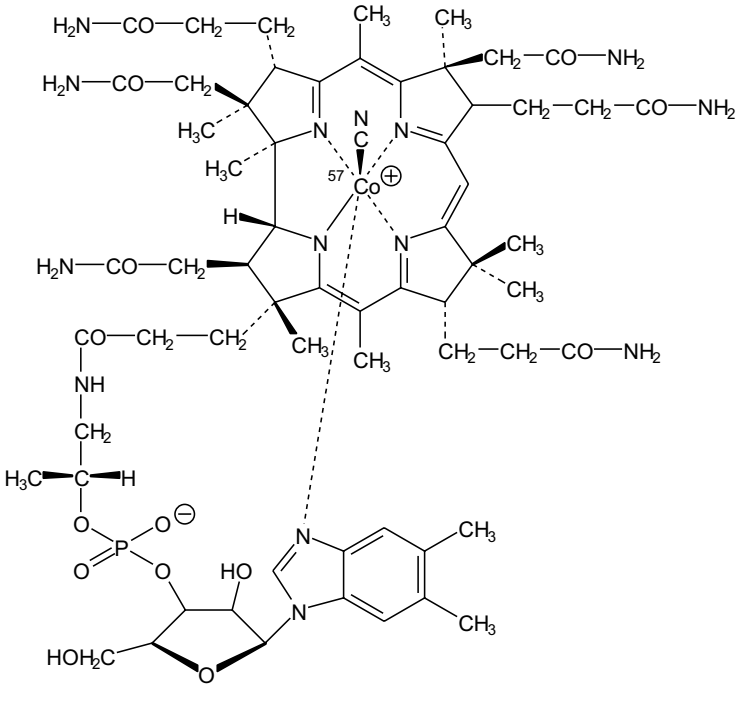
Ve vzduchotěsných obalech, chráněn před světlem, při teplotě 2 °C až 8 °C za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Cyanocobalamini[^{57}Co] solutio

Roztok s kyanokobalaminem[^{57}Co]



Je to roztok obsahující kyanid [^{57}Co]-α-(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamidu. Může obsahovat stabilizační a protimikrobní přísady. Kobalt-57 je radioaktivní izotop kobaltu, který může být

vyroben ozařováním niklu protony o vhodné energii. Kyanokobalamin[^{57}Co] může být připraven růstem vhodných mikroorganismů v prostředí obsahujícím [^{57}Co]kobaltový iont. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity kobaltu-57 k referenčnímu datu uvedenému v označení. Nejméně 90 % kobaltu-57 je ve formě kyanokobalaminu.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo slabě růžový roztok.
Kobalt-57 má poločas přeměny 271 dní a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca,* které se významně neliší od spektra referenčního roztoku kobaltu-57. Referenční roztok kobaltu-57 a referenční roztok kobaltu-58 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama kobaltu-57 mají energii 0,122 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Retenční čas hlavního píku na radiochromatogramu zkoušeného roztoku se prakticky shoduje s retenčním časem píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 6,0.

Radionuklidová čistota. Zaznamená se spektrum záření gama způsobem popsaným v článku *Radiofarmaca* za použití vhodného zařízení kalibrovaného pomocí referenčního roztoku kobaltu-57 a kobaltu-58. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku kobaltu-57. Stanoví se relativní obsah kobaltu-57, kobaltu-56 a kobaltu-58. Kobalt-56 má poločas přeměny 78 dní a jeho přítomnost dokazují fotony gama o energii 0,847 MeV. Kobalt-58 má poločas přeměny 70,8 dne a jeho přítomnost dokazují fotony gama o energii 0,811 MeV. Z celkové radioaktivity připadá nejvýše 0,1 % na kobalt-56, kobalt-58 a další radionuklidové nečistoty.

Radiochemická čistota. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyanokobalaminu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml. Použitelnost roztoku je 1 h.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (10 g/l) (26,5 + 73,5), jejíž pH bylo upraveno na 3,5 *kyselinou fosforečnou R.* Průtoková rychlost je 1,0 ml/min. Směs lze použít do dvou dnů od přípravy,
- detektoru radioaktivity nastaveného na kobalt-57,
- spektrofotometrického detektoru při 361 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 100 μl každého roztoku. Zaznamená se chromatogram zkoušeného roztoku po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času kyanokobalaminu a z ploch píků se vypočítá procentuální obsah kobaltu-57 přítomného jako kyanokobalamin.

Chromatogram porovnávacího roztoku se zaznamenává po dobu 30 min.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita zkoušeného přípravku a referenčního roztoku kobaltu-57 za použití vhodného zařízení postupem popsaným v článku *Radiofarmaca.*

Uchovávání

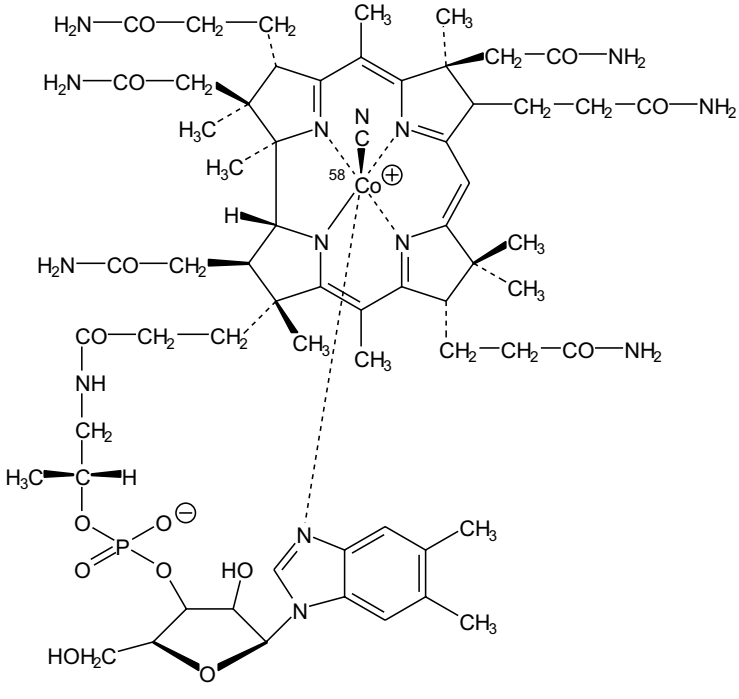
Chráněn před světlem při teplotě 2 °C až 8 °C za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Cyanocobalamini[^{58}Co] solutio

Roztok s kyanokobalaminem[^{58}Co]



Je to roztok obsahující kyanid [^{58}Co]-α–(5,6-dimethylbenzimidazol-1-yl)kobamidu. Může obsahovat stabilizační a protimikrobní přísady. Kobalt-58 je radioaktivní izotop kobaltu, který může být vyroben ozařováním niklu neutrony. Kyanokobalamin[^{58}Co] může být připraven růstem vhodných mikroorganismů v prostředí obsahujícím [^{58}Co]kobaltový iont. Přípravek obsahuje 90 % až 110 % deklarované radioaktivity kobaltu-58 k referenčnímu datu uvedenému v označení. Nejméně 90 % kobaltu-58 je ve formě kyanokobalaminu.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo slabě růžový roztok.
Kobalt-58 má poločas přeměny 70,8 dne a emituje záření beta (β^+) a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem popsaným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra porovnávacího roztoku kobaltu-58. Referenční roztok kobaltu-58, referenční roztok kobaltu-57 a referenční roztok kobaltu-60 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama kobaltu-58 mají energii 0,511 MeV (anihilační pík) a 0,811 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Retenční čas hlavního píku na radiochromatogramu zkoušeného roztoku se prakticky shoduje s retenčním časem píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 6,0.

Radionuklidová čistota. Zaznamená se spektrum záření gama způsobem popsaným v článku *Radiofarmaca* za použití vhodného zařízení, poskytujícího odpovídající rozlišení, kalibrovaného pomocí referenčního roztoku kobaltu-58, kobaltu-57 a kobaltu-60. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku kobaltu-58. Stanoví se relativní obsah kobaltu-58, kobaltu-57 a kobaltu-60. Kobalt-57 má poločas přeměny 271 dní a jeho přítomnost dokazují fotony gama o energii 0,122 MeV. Kobalt-60 má poločas přeměny 5,27 roku a jeho přítomnost dokazují fotony gama o energii 1,173 MeV a 1,332 MeV. Z celkové radioaktivity připadá nejvýše 1,0 % na kobalt-60 a nejvýše 2,0 % na kobalt-57, kobalt-60 a další radionuklidové nečistoty.

Radiochemická čistota. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok. 10 mg *kyanokobalaminu CRL* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100 ml. 2 ml tohoto roztoku se zředí mobilní fází na 100 ml. Použitelnost roztoku je 1 h.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4 mm naplněné *silikagelem oktylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (10 g/l) (26,5 + 73,5), jejíž pH bylo upraveno na 3,5 *kyselinou fosforečnou R.* Průtoková rychlost je 1,0 ml/min. Směs lze použít do dvou dnů od přípravy,
- detektoru radioaktivity nastaveného na kobalt-58,
- spektrofotometrického detektoru při 361 nm,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se odděleně po 100 μl každého roztoku. Zaznamená se chromatogram zkoušeného roztoku po dobu odpovídající trojnásobku retenčního času kyanokobalaminu a z ploch píků se vypočítá procentuální obsah kobaltu-58 přítomného jako kyanokobalamin.

Chromatogram porovnávacího roztoku se zaznamenává po dobu 30 min.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita zkoušeného přípravku a referenčního roztoku kobaltu-58 za použití vhodného zařízení postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* nebo se měří na zařízení kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem při teplotě 2 °C až 8 °C za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Fibrinogenum humanum iodinatum[^{125}I] cryodesiccatum

Lyofilizovaný lidský fibrinogen značený jodem[^{125}I]

Je to sterilní roztok lidského fibrinogenu značeného jodem-125, prostý pyrogenních látek. Lidský fibrinogen se připravuje z plazmy, která vyhovuje článku *Plasma humanum ad separationem.* Způsob přípravy je zvolen tak, aby se zabránilo přenosu známých infekčních agens nebo aby se tato agens inaktivovala a aby v konečném přípravku byl obsah fibrinogenu nejméně 80 % z celkového obsahu bílkoviny. Přípravek může obsahovat aditiva, jako je citronan sodný a lidský albumin.

Rozpuštěný přípravek obsahuje 85,0 % až 115,0 % deklarované radioaktivity jodu-125 k referenčnímu datu uvedenému v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá jodu-125 vázanému na bílkovinu a nejméně 80 % z celkové radioaktivity odpovídá látkám vázaným na srazitelnou bílkovinu. Na jod-126 připadá nejvýše 1,0 % z celkové radioaktivity.

Vlastnosti

Bílý nebo slabě žlutý prášek nebo drobivá pevná látka.

Jod-125 má poločas přeměny 60,1 dne a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-125, kromě rozdílů způsobených přítomností jodu-126. Referenční roztok jodu-125 a referenční roztok cesia-137 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony přípravku mají energii 0,027 MeV, která odpovídá rtg-záření dceřiného telluru. Jod-126 má poločas přeměny 13,0 dne a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,388 MeV a 0,666 MeV.

B. Provedou se precipitační zkoušky s vhodným rozsahem druhově specifických antisér. Zkouška se provádí za použití antisér specifických proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných v příslušné zemi k přípravě látek biologického původu. Přípravek

obsahuje bílkoviny lidského původu a dává negativní reakce se specifickými antiséry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

C. Zkouška Srážlivost je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,5; měří se rozpuštěný přípravek.

Jod-126. Vhodným přístrojem se zaznamenají spektra záření gama a rtg-záření rozpuštěného přípravku způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca* a porovnají se se spektry referenčních roztoků jodu-125 a cesia-137. Stanoví se relativní obsah přítomného jodu-125 a jodu-126 za předpokladu, že fotony gama jodu-126 o energii 0,666 MeV jsou emitovány v 33 % přeměn a fotony gama cesia-137 o energii 0,661 MeV v 85,4 % přeměn.

Radiochemická čistota. Rozpuštěný přípravek se zkouší zónovou elektroforézou *(2.2.31)* za použití papírového pruhu dlouhého 20 cm jako nosiče a *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,4* jako elektrolytu.

Na papír se nanese 10 μl rozpuštěného přípravku do 3 mm širokého proužku ve vzdálenosti 100 mm od anody a nechá se vyvíjet 60 min pod stabilizovaným proudem při napětí asi 200 V. Proužek se nechá usušit a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Jodidový iont se posune přibližně 7 cm k anodě a jodem označený fibrinogen zůstane většinou na startu. Radioaktivita odpovídající jodu-125 vázanému na bílkovinu je nejméně 95 % z celkové radioaktivity elektroforeogramu.

Srážlivost. Ke 0,2 ml rozpuštěného přípravku se přidá 5 ml lidské plazmy a po zamíchání se přenese po 1 ml této směsi do dvou zkumavek obsahujících 2 ml *tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,4.* Do jedné zkumavky se přidá 0,1 ml roztoku obsahujícího 10 m.j. *trombinu hovězího R.* (1 m.j. trombinu srazí 2,5 g/l fibrinogenu (více než 90% srážlivost) za 15 s při 37 °C.) Obsah této zkumavky se důkladně zamíchá skleněnou tyčinkou a nechá se stát nejméně 1 h, aniž se tyčinka vyjme, pak se z ní odstraní sraženina i s tyčinkou. Vezme se 1 ml zbylého roztoku a 1 ml porovnávacího roztoku, do kterého nebyl přidán hovězí trombin, změří se radioaktivita obou roztoků a stanoví se procento radioaktivity obsažené ve sraženině.

Sraženina obsahuje nejméně 80 % z celkové radioaktivity.

Sterilita. Rozpuštěný přípravek vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny (*2.6.14*). Nejvýše 175/*V* m.j. endotoxinu v mililitru. Obsah lahvičky se rozpustí ve vhodném objemu (*V* ml) předepsaného rozpouštědla.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita rozpuštěného přípravku postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-125 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku. Použije se přístroj se scintilačním detektorem, např. s tenkým krystalem jodidu sodného, a nastaví se tak, aby příspěvek radioaktivity jodu-126 byl minimalizován.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

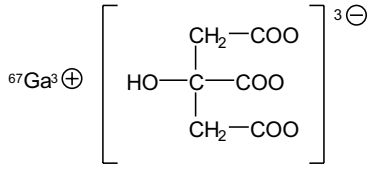
Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede:
- způsob rozpouštění,
- že přípravek by měl být používán ihned po rozpuštění.

Gallii[^{67}Ga] citratis solutio iniectabilis

1998

Injekce s citronanem gallitým[^{67}Ga]



Je to sterilní roztok obsahující gallium-67 ve formě citronanu gallitého. Může být izotonizován přídavkem chloridu sodného a citronanu sodného a může obsahovat vhodné protimikrobní přísady, jako je benzylalkohol. Gallium-67 je radioaktivní izotop gallia, může být získán ozařováním zinku, který může být obohacen zinkem-68, protony o vhodné energii. Gallium-67 může být odděleno od zinku extrakcí do rozpouštědla nebo sloupcovou chromatografií. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity gallia-67 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Na gallium-66 připadá nejvýše 0,2 % z celkové radioaktivity.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Gallium-67 má poločas přeměny 3,26 dne a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku gallia-67. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku gallia-67. Referenční roztok gallia-67 se získává od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,093 MeV, 0,185 MeV a 0,300 MeV.

B. K 0,2 ml zkoušeného přípravku se přidá 0,2 ml roztoku obsahujícího roztok *chloridu železitého R* (1 g/l) a roztok *kyseliny chlorovodíkové R* (0,1% *V/V*) a zamíchá se. Zbarvení roztoku se porovná se zbarvením roztoku připraveným stejným způsobem a obsahujícím *benzylalkohol R* (9 g/l) a *chlorid sodný R* (7 g/l). Žluté zbarvení vznikne pouze u roztoku se zkoušeným přípravkem.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 5,0 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku gallia-67, kromě rozdílů způsobených přítomností gallia-66. Gallium-66 má poločas přeměny 9,4 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 1,039 MeV. Z celkové radioaktivity připadají na gallium-66 nejvýše 0,2 %.

Zinek. K 0,1 ml zkoušeného přípravku se přidá 0,9 ml *vody R*, 5 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,7*, 1 ml roztoku *thiosíranu sodného R* (250 g/l) a 5,0 ml roztoku dithizonu připraveného následujícím způsobem: 10 mg *dithizonu R* se rozpustí ve 100 ml *2-butanonu R*, nechá se 5 min stát, zfiltruje se a těsně před použitím se zředí na desetinásobný objem *2-butanonem R.* 2 min se důkladně protřepává a oddělí se organická vrstva. Změří se absorbance *(2.2.25)* organické vrstvy při 530 nm proti organické vrstvě kontrolního roztoku připraveného současně stejným způsobem. Absorbance není větší než absorbance organické vrstvy porovnávacího roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 0,1 ml základního *roztoku zinku (5 µg Zn/ml).*

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem gallia-67 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

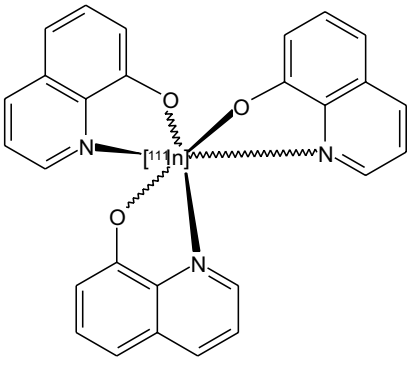
Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

Indii[^{111}In]oxini solutio

Roztok s oxinatem inditým[^{111}In]



$C_{27}H_{18}[^{111}In]N_3O_3$ M_r 547,2

3302 *Indii[^{111}In]oxini solutio*

Je to sterilní roztok india-111 ve formě komplexu s 8-hydroxychinolinem. Může obsahovat vhodné povrchově aktivní látky a může být izotonizován přídavkem chloridu sodného a vhodného tlumivého roztoku. Indium-111 je radioaktivní izotop india, který může být vyroben ozařováním kadmia protony o vhodné energii. Roztok obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity india-111 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Na jiné radionuklidy, než je indium--111, připadá nejvýše 0,25 % z celkové radioaktivity. Nejméně 90 % radioaktivity odpovídá indiu--111 ve formě komplexu s oxinatem. Je zvolen takový způsob přípravy, že se nepřidává žádný nosič a měrná aktivita není menší než 1,85 GBq india-111 v mikrogramu india.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Indium-111 má poločas přeměny 2,8 dne a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. *Zkouška se provede po dostatečně dlouhé době, aby se neuplatňovaly krátkodobé radionuklidy, jako je indium-110m.* Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku india--114m. Referenční roztok india-111 a referenční roztok india-114m se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama india-111 mají energie 0,171 MeV a 0,245 MeV.

B. 5 mg až 10 mg *oxidu hořečnatého R* se umístí do skleněné zkumavky o průměru asi 20 mm, přidá se 20 μl zkoušeného roztoku a pozoruje se v ultrafialovému světle při 365 nm; vzniká jasně žlutá fluorescence.

C. Rozdělení radioaktivity mezi organickou a vodnou vrstvu ve zkoušce Radiochemická čistota je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 6,0 až 7,5.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m.

Indium-114m. *Zkouška se provede po dostatečně dlouhé době, aby se neuplatňovaly krátkodobé radionuklidy, jako je indium-110m.* Zaznamená se spektrum záření gama pomocí vhodného detektoru s olověnou clonou o tloušťce 6 mm umístěnou mezi vzorek o radioaktivitě asi 30 MBq a detektor. Odezva v oblasti odpovídající fotonům india-114m o energiích 0,558 MeV a 0,725 MeV nepřevyšuje odezvu získanou za použití referenčního roztoku india-114m (0,25 %) o radioaktivitě 75 kBq měřeného za stejných podmínek; všechna měření jsou vztažena k datu a hodině podání. Referenční roztoky india-111 a india-114m se získají od národní laboratoře.

Poznámka. Roztok s oxinatem inditým[^{111}In] není určen pro přímé podání. Značí se jím in vitro bílé krvinky nebo krevní destičky, které se pak injekčně podávají pacientovi.

Radiochemická čistota. Do silanizované dělicí nálevky obsahující 3 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) se přidá 100 μl zkoušeného roztoku a promíchá se. Přidá se 6 ml *oktanolu R* a intenzivně se protřepává. Po oddělení se spodní a pak i horní vrstva přenesou do vhodných stejných

lahviček. Dělicí nálevka se promyje 1 ml *oktanolu R* intenzivním protřepáním a promývací tekutina se přidá do lahvičky s organickou vrstvu. Pak se dělicí nálevka promyje 5 ml *kyseliny chlorovodíkové RS* intenzivním protřepáváním a promývací tekutina se přenese do třetí lahvičky. Všechny lahvičky se uzavřou a za použití vhodného zařízení se změří radioaktivita v každé lahvičce, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca.* Vypočítá se radiochemická čistota, vyjadřující radioaktivitu india--111 ve formě komplexu s oxinatem nalezenou v organické vrstvě, jako procento radioaktivity naměřené ve třech roztocích. Nejméně 90 % radioaktivity odpovídá indiu-111 ve formě komplexu s oxinatem.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem india-111 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Indii[^{111}In] pentetatis solutio iniectabilis

Injekce s pentetanem inditým[^{111}In]

Je to sterilní roztok prostý pyrogenních látek obsahující indium-111 ve formě diethylentriaminopentaacetatu inditého. Může obsahovat vápník a může být izotonizován přídavkem chloridu sodného a vhodného tlumivého roztoku. Indium-111 je radioaktivní izotop india, může být získán ozařováním kadmia, které může být obohaceno kadmiem-111 nebo kadmiem-112, protony o příslušné energii. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity india-111 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení.

Radioaktivita připadající na indium-114m není v čase podání vyšší než 0,2 % z celkové radioaktivity. Nejméně 95 % radioaktivity připadá na komplex pentetanu s indiem-111.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Indium-111 má poločas přeměny 2,8 dne a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku

india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku india-114m. Referenční roztok india-111 a referenční roztok india-114m se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama india-111 mají energie 0,171 MeV a 0,245 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,0 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku india-111, kromě rozdílů způsobených přítomností india-114m.

Indium-114m. Zkoušený přípravek se ponechá dostatečně dlouhou dobu, aby se radioaktivita india-111 rozpadem snížila na dostatečně nízkou hodnotu umožňující měření radionuklidových nečistot. Potom se zaznamená spektrum záření gama vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku india-114m. Indium-114m má poločas přeměny 49,5 dne a nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,190 MeV. Radioaktivita připadající na indium-114m není v čase podání vyšší než 0,2 % celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Deska se zahřívá 10 min při 110 °C, při vyvíjení čelo mobilní fáze během 10 min dosáhne 10 cm až 15 cm.

Nanese se 5 µl až 10 µl zkoušeného přípravku a nechá se usušit. Vyvíjí se roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm. Vrstva se usuší na vzduchu a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Komplex pentetanu india se pohybuje v blízkosti čela rozpouštědla, radioaktivita skvrny odpovídající tomuto komplexu je nejméně 95 % z celkové radioaktivity.

Kadmium. Nejvýše 5 µg/ml; provede se atomová absorpční spektrometrie *(2.2.23, Metoda II)*.

Zkoušený roztok. 0,1 ml zkoušeného přípravku se smíchá s 0,9 ml směsi objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (1 + 99).
Porovnávací roztoky. Připraví se za použití základního *roztoku kadmia (0,1 % Cd)* zředěním směsí objemových dílů *kyseliny chlorovodíkové R* a *vody R* (1 + 99).

Změří se absorbance při 228,8 nm za použití kadmiové lampy s dutou katodou jako zdroje záření a plamene vzduch-acetylen.

Volná kyselina diethylentriaminopentaoctová. V mikrozkumavce se smíchá 100 µl zkoušeného přípravku se 100 µl čerstvě připraveného roztoku *modře hydroxynaftolové R* (1 g/l) v *hydroxidu sodném 1 mol/l RS*. Přidá se 50 µl roztoku *chloridu vápenatého R* (0,15 g/l). Zbarvení roztoku zůstane růžovofialové nebo se změní z modrého na růžovofialové (0,4 mg/ml).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 14/*V* m.j. endotoxinu v mililitru, kde *V* je doporučená maximální dávka v mililitrech.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem india-111 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

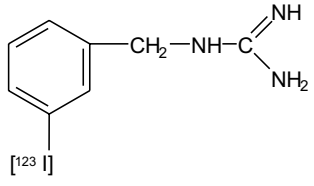
Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Iobenguani[^{123}I] solutio iniectabilis

Injekce s jobenguanem[^{123}I]



$C_8H_{10}[^{123}I]N_3$

Je to sterilní roztok 1-(3-[^{123}I]jodbenzyl)guanidinu prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Může také obsahovat zbytky použitého katalyzátoru, jako je měď v iontové formě, vhodnou stabilizační přísadu, jako je kyselina askorbová, a protimikrobní přísady. Jod-123 je radioaktivní izotop jodu, který může být získán ozařováním xenonu, obohaceného xenonem-124 (nejméně 98 %), protony a následnou přeměnou vzniklého cesia-123 přes xenon-123 na jod-123. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-123 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá jodu-123 ve formě jobenguanu. Měrná aktivita není menší než 10 GBq jodu-123 v gramu báze jobenguanu. Na jiné radionuklidy než jod-123 připadá nejvýše 0,35 % z celkové radioaktivity.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo slabě žlutý roztok.
Jod-123 má poločas přeměny 13,2 h a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-123, kromě rozdílů způsobených přítomností jodu-125, telluru-121 a jiných radionuklidových nečistot. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-123 mají energii 0,159 MeV. Jod-125 má poločas přeměny 59,4 dne a emituje rtg-záření o energii 0,027 MeV a fotony o energii 0,035 MeV. Tellur-121 má poločas přeměny 19,2 dne a nejvíce zastoupené fotony mají energie 0,507 MeV a 0,573 MeV. Referenční roztoky jodu-123, jodu-125 a telluru-121 se získávají od národní laboratoře.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH. 3,5 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Stanoví se relativní obsah jodu-125, telluru-121 a jiných přítomných radionuklidových nečistot. Nejsou detegovány jiné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než má jod-125. Pro stanovení jodu-125, telluru-121 a jiných radionuklidových nečistot se zkoušený roztok nechá stát po dostatečně dlouhou dobu, aby radioaktivita jodu-123 klesla na hodnotu vhodnou pro stanovení těchto nečistot. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření přeměněných radionuklidů způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Na jiné radionuklidy než jod-123 připadá nejvýše 0,35 % z celkové radioaktivity. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Radiochemická čistota. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok (a). 0,100 g *jodidu sodného R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *jobenguaniumsulfatu CRL* se rozpustí v 50 ml mobilní fáze a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *dusičnanu amonného R* (80 g/l), *amoniaku RS2* a *methanolu R* (1 + 2 + 27) a jejíž průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- vhodného detektoru radioaktivity,
- spektrofotometru s průtokovým uspořádáním při 254 nm,
- injektorové smyčky, 10 μl.

Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztoky. Nejméně 95 % radioaktivity chromatogramu odpovídá píku jobenguanu. Nejvýše 4 % radioaktivity odpovídají píku jodidu a nejvýše 1 % radioaktivity se nachází v ostatních píkách.

Měrná aktivita. Vypočítá se z údajů získaných ve zkoušce Radiochemická čistota. Obsah jobenguaniumsulfatu se stanoví z ploch píků odpovídajících jobenguanu na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Obsah báze jobenguanu se vypočítá vynásobením získaného výsledku faktorem 0,85.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 175/*V* m.j. endotoxinu v mililitru, kde *V* je doporučená maximální dávka v mililitrech.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-123 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

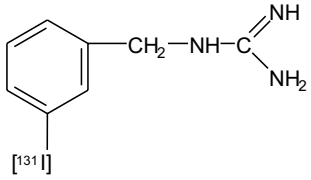
Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede měrná aktivita vyjádřená v GBq jodu-123 na gram báze jobenguanu.

Iobenguani[^{131}I] solutio iniectabilis ad usum diagnosticum

Injekce s jobenguanem[^{131}I] pro diagnostické použití



$C_8H_{10}[^{131}I]N_3$

Je to sterilní roztok 1-(3-[^{131}I]jodbenzyl)guanidinu prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Může také obsahovat zbytky použitého katalyzátoru, jako je měď v iontové formě, vhodnou stabilizační přísadu, jako je kyselina askorbová, a protimikrobní přísady. Jod-131 je radioaktivní izotop jodu, který může být získán ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 94 % radioaktivity odpovídá jodu-131 ve formě jobenguanu. Měrná aktivita není menší než 20 GBq jodu-131 v gramu báze jobenguanu.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo slabě žlutý roztok.

Jod-131 má poločas přeměny 8,04 dne a emituje záření beta a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Referenční roztok jodu-131 se získává od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-131 mají energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních radionuklidových nečistot. Jod-133 má poločas přeměny 20,8 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,530 MeV a 0,875 MeV. Jod-135 má poločas přeměny 6,55 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,527 MeV, 1,132 MeV a 1,260 MeV. Na jod-131 připadá nejméně 99,9 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok (a). 0,100 g *jodidu sodného R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.
Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *jobenguaniumsulfatu CRL* se rozpustí v 50 ml mobilní fáze a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *dusičnanu amonného R* (80 g/l), *amoniaku RS2* a *methanolu R* (1 + 2 + 27) a jejíž průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- vhodného detektoru radioaktivity,
- spektrofotometru s průtokovým uspořádáním při 254 nm,
- injektorové smyčky, 10 μl.

Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztoky. Nejméně 94 % radioaktivity chromatogramu odpovídá píku jobenguanu. Nejvýše 5 % radioaktivity odpovídá píku jodidu a nejvýše 1 % radioaktivity se nachází v ostatních píkách.

Měrná aktivita. Vypočítá se z údajů získaných ve zkoušce Radiochemická čistota. Obsah jobenguaniumsulfatu se stanoví z ploch píků odpovídajících jobenguanu na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Obsah báze jobenguanu se vypočítá vynásobením získaného výsledku faktorem 0,85.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 175/*V* m.j. endotoxinu v mililitru, kde *V* je doporučená maximální dávka v mililitrech.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-131 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede měrná aktivita vyjádřená v GBq jodu-131 na gram báze jobenguanu.

Iobenguani[^{131}I] solutio iniectabilis ad usum therapeuticum

Injekce s jobenguanem[^{131}I] pro terapeutické použití

$C_8H_{10}[^{131}I]N_3$

Je to sterilní roztok 1-(3-[^{131}I]jodbenzyl)guanidinu prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Může také obsahovat zbytky použitého katalyzátoru, jako je měď v iontové formě, vhodnou stabilizační přísadu, jako je kyselina askorbová, a protimikrobní přísady. Jod-131 je radioaktivní izotop jodu, který může být získán ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 92 % radioaktivity odpovídá jodu-131 ve formě jobenguanu. Měrná aktivita není menší než 400 GBq jodu-131 v gramu báze jobenguanu.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo slabě žlutý roztok.

Jod-131 má poločas přeměny 8,04 dne a emituje záření beta a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Referenční roztok jodu-131 se získává od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-131 mají energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 3,5 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních radionuklidových nečistot. Jod-133 má poločas přeměny 20,8 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,530 MeV a 0,875 MeV. Jod-135 má poločas přeměny 6,55 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,527 MeV, 1,132 MeV a 1,260 MeV. Na jod-131 připadá nejméně 99,9 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.

Porovnávací roztok (a). 0,100 g *jodidu sodného R* se rozpustí v mobilní fázi a zředí se jí na 100,0 ml.

Porovnávací roztok (b). 20,0 mg *jobenguaniumsulfatu CRL* se rozpustí v 50 ml mobilní fáze a zředí se jí na 100,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,0 mm naplněné *silikagelem pro chromatografii R* (5 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů roztoku *dusičnanu amonného R* (80 g/l), *amoniaku RS2* a *methanolu R* (1 + 2 + 27) a jejíž průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- vhodného detektoru radioaktivity,
- spektrofotometru s průtokovým uspořádáním při 254 nm,
- injektorové smyčky, 10 μl.

Nastříkne se zkoušený roztok a porovnávací roztoky. Nejméně 92 % radioaktivity chromatogramu odpovídá píku jobenguanu. Nejvýše 7 % radioaktivity odpovídá píku jodidu a nejvýše 1 % radioaktivity se nachází v ostatních píkách.

Měrná aktivita. Vypočítá se z údajů získaných ve zkoušce Radiochemická čistota. Obsah jobenguaniumsulfatu se stanoví z ploch píků odpovídajících jobenguanu na chromatogramech zkoušeného roztoku a porovnávacího roztoku (b). Obsah báze jobenguanu se vypočítá vynásobením získaného výsledku faktorem 0,85.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek může být používán před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14).* Nejvýše 175/*V* m.j. endotoxinu v mililitru, kde *V* je doporučená maximální dávka v mililitrech.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-131 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede měrná aktivita vyjádřená v GBq jodu-131 na gram báze jobenguanu.

Natrii chromatis[^{51}Cr] solutio sterilis

Sterilní roztok s chromanem[^{51}Cr] sodným

Je to sterilní roztok chromanu[^{51}Cr] sodného, izotonizovaný přídavkem chloridu sodného. Chrom-51 je radioaktivní izotop chromu, který může být připraven ozařováním chromu přírodního izotopového složení nebo chromu obohaceného chromem-50 neutrony. Roztok obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity chromu-51 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 90 % radioaktivity odpovídá chromu-51 ve formě chromanu. Měrná aktivita je nejméně 370 MBq chromu-51 v miligramu chromanového iontu.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo slabě žlutý roztok.
Chrom-51 má poločas přeměny 27,7 dne a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku chromu-51. Referenční roztok chromu-51 se získává od národní laboratoře. Energie fotonů gama je 0,320 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,5.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku chromu-51.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Na papír se nanese množství roztoku dostatečné pro detekční metodu a ihned se vyvíjí směsí objemových dílů *amoniaku 17,5% R*, *lihu 96% R* a *vody R* (25 + 50 + 125) po dobu 2,5 h; chromité ionty zůstávájí na startu. Vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Skvrna o R_F asi 0,9 odpovídá chromanu sodnému a představuje nejméně 90 % z celkové radioaktivity chromatogramu.

Celkový chroman. Nejvýše 2,7 μg chromanových iontů (CrO_4^{2-}) v MBq.

Měří se absorbance *(2.2.25)* zkoušeného roztoku v maximu při 370 nm a porovnávacího roztoku připraveného za použití roztoku *chromanu draselného R* (1,7 g/l). Je-li to nutné, upraví se hodnota pH zkoušeného a porovnávacího roztoku na 8 přídavkem *hydrogenuhličitanu sodného RS*. Po změření absorbance se vypočítá obsah chromanu ve zkoušeném roztoku.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem chromu-51 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

Natrii iodidi[^{131}I] capsulae ad usum diagnosticum

Tobolky s jodidem[^{131}I] sodným pro diagnostické použití

Jsou to tobolky, které obsahují jod-131 ve formě jodidu sodného ve vhodném pevném základu. Tobolky také obsahují thiosíran sodný nebo jiné redukující látky a mohou obsahovat vhodný tlumivý roztok. Jod-131 je radioaktivní izotop jodu; může být získán ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Každá tobolka obsahuje 90 % až 110 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Na jiné radionuklidy než jod-131 připadá nejvýše 0,1 % z celkové radioaktivity. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá jodu-131 ve formě jodidu. Způsob přípravy je zvolen tak, aby měrná aktivita nebyla menší než 185 GBq jodu-131 v miligramu jodu. Tobolky vyhovují požadavkům na tvrdé tobolky uvedeným v článku *Capsulae,* pokud není uvedeno a schváleno jinak.

Vlastnosti

Jod-131 má poločas přeměny 8,04 dne a emituje záření beta a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Referenční roztok jodu-131 se získává od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-131 mají energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Radionuklidová čistota. Použije se příslušný objem roztoku získaného ve zkoušce Rozpadavost. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních radionuklidových nečistot. Jod-133 má poločas přeměny 20,8 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,530 MeV a 0,875 MeV.

Jod-135 má poločas přeměny 6,55 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,527 MeV, 1,132 MeV a 1,260 MeV. Na jod-131 připadá nejméně 99,9 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Zkoušený roztok. Obsah jedné tobolky se rozpustí v 5 ml *vody R*.

Na pruh vhodného papíru se nanese 10 µl zkoušeného roztoku. Na stejné místo bez předchozího sušení se nanese 10 µl roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhličitan sodný R* (10 g/l). Vyvíjí se bez předchozího sušení směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (30 + 70) po dráze 10 cm. Papír se nechá usušit a vhodným detektorem se stanoví radioaktivita. Nejméně 95 % z celkové radioaktivity chromatogramu odpovídá skvrně jodidu. Papír se postříká *chloridem paladnatým RS* a vysuší se v proudu horkého vzduchu. Skvrna jodidu se zbarví hnědě a skvrna jodičnanu se zbarví žlutě.

Rozpadavost. 10 ml roztoku *jodidu draselného R* (2,0 g/l) se zahřívá v malé kádince ve vodní lázni při 37 °C, přidá se jedna tobolka a míchá se magnetickým míchadlem při 20 ot/min až do úplného rozpuštění obalu tobolky i jejího obsahu (asi 15 min).

Obsahová stejnoměrnost. Jednotlivě se stanoví radioaktivita nejméně deseti tobolek za použití vhodného přístroje při dodržení stejných geometrických podmínek a vypočítá se průměrná radioaktivita jedné tobolky. Radioaktivita jednotlivých tobolek se neliší od průměrné radioaktivity o více než 10 %. Relativní směrodatná odchylka není větší než 3,5 %.

Stanovení radioaktivity

Průměrná radioaktivita stanovená ve zkoušce Obsahová stejnoměrnost je 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Natrii iodidi[^{123}I] solutio

Roztok s jodidem[^{123}I] sodným

Je to roztok pro perorální podávání obsahující jod-123 ve formě jodidu sodného. Obsahuje také thiosíran sodný nebo jinou vhodnou redukující látku a může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Jod-123 je radioaktivní izotop jodu, který může být získán ozařováním xenonu, obohaceného xenonem-124 (nejméně 98 %), protony a následnou přeměnou vzniklého cesia-123 přes xenon-123 na jod-123. Roztok obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-123 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá jodu-123 ve formě jodidu. Měrná aktivita není menší než 185 GBq jodu-123 v miligramu jodu. Na jiné radionuklidy než jod-123 připadá nejvýše 0,35 % z celkové radioaktivity.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Jod-123 má poločas přeměny 13,2 h a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-123, kromě rozdílů způsobených přítomností jodu-125, telluru-121 a jiných radionuklidových nečistot. Referenční roztoky jodu-123, jodu-125 a telluru-121 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-123 mají energii 0,159 MeV a jsou doprovázeny rtg-záře-ním o energii 0,027 MeV. Jod-125 má poločas přeměny 59,4 dne, emituje rtg-záření o energii 0,027 MeV a fotony o energii 0,035 MeV. Tellur-121 má poločas přeměny 19,2 dne a nejvíce zastoupené fotony mají energie 0,507 MeV a 0,573 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH. 7,0 až 10,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Stanoví se relativní obsah jodu-125, telluru-121 a jiných přítomných radionuklidových nečistot. Nejsou detegovány jiné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než má jod-125. Pro stanovení jodu-125, telluru-121 a jiných radionuklidových nečistot se zkoušený roztok ponechá dostatečně dlouhou dobu, aby radioaktivita jodu-123 klesla na hodnotu umožňující stanovení těchto nečistot. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření přeměněných radionuklidů způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Na jiné radionuklidy než jod-123 připadá nejvýše 0,35 % z celkové radioaktivity. Roztok se může použít před dokončením zkoušky.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* tak, aby radioaktivita odpovídala asi 20 000 impulzů/min na 10 µl. Přidá se stejný objem roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhličitan sodný R* (10 g/l) a promíchá se.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *jodidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,2 g *jodičnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na proužek vhodného papíru 25 cm dlouhého se odděleně nanese 20 µl zkoušeného roztoku, 10 µl porovnávacího roztoku (a) a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 30) po dráze 20 cm (asi 2 h). Papír se usuší na vzduchu a přiložením filtračních papírů nasycených *kyselinou octovou R* s *jodičnanem draselným R* a *kyselinou octovou R* s *jodidem draselným R* se stanoví polohy neaktivního jodidu draselného a jodičnanu draselného. Vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se ve skvrně odpovídající jodidu nachází nejméně 95 % celkové radioaktivity a hodnota R_F se neodlišuje o více než 5 % od R_F hodnoty odpovídající neaktivnímu jodidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-123 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

Natrii iodidi[^{125}I] solutio

Roztok s jodidem[^{125}I] sodným

Je to roztok pro perorální podávání, který obsahuje jod-125 ve formě jodidu sodného. Obsahuje také thiosíran sodný nebo jinou vhodnou redukující látku a může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Jod-125 je radioaktivní izotop jodu, který může být získán ozařováním xenonu neutrony. Roztok obsahuje 85,0 % až 115,0 % deklarované radioaktivity jodu-125 k referenčnímu datu uvedenému v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá jodu-125 ve formě jodidu. Způsob přípravy je zvolen tak, aby měrná aktivita nebyla menší než 74 GBq jodu-125 v miligramu jodu k referenčnímu datu uvedenému v označení. Jodu-126 odpovídá nejvýše 1,0 % z celkové radioaktivity.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Jod-125 má poločas přeměny 60,1 dne a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-125, kromě rozdílů způsobených přítomností jodu-126. Referenční roztoky jodu-125 a cesia-137 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony v přípravku mají energii 0,027 MeV, která odpovídá rtg-záření telluru. Jod-126 má poločas přeměny 13,0 dne a jeho přítomnost se projeví nejvíce zastoupenými fotony gama s energiemi 0,388 MeV a 0,666 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 7,0 až 10,0.

Jod-126. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca* a provede se přímé porovnání se spektry referenčních roztoků jodu-125 a cesia-137. Stanoví se relativní obsah jodu-125 a jodu-126 za předpokladu, že fotony gama

jodu-126 o energii 0,666 MeV jsou emitovány v 33 % přeměn a fotony gama cesia-137 o energii 0,661 MeV v 85,4 % přeměn.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* tak, aby radioaktivita odpovídala asi 20 000 impulzů/min na 10 µl. Přidá se stejný objem roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhličitan sodný R* (10 g/l) a promíchá se.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *jodidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,2 g *jodičnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na proužek vhodného papíru 25 cm dlouhého se odděleně nanese 20 µl zkoušeného roztoku, 10 µl porovnávacího roztoku (a) a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 30) po dráze 20 cm (asi 2 h). Papír se usuší na vzduchu a přiložením filtračních papírů nasycených *kyselinou octovou R* s *jodičnanem draselným R* a *kyselinou octovou R* s *jodidem draselným R* se stanoví polohy neaktivního jodidu draselného a jodičnanu draselného. Vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se ve skvrně odpovídající jodidu nachází nejméně 95 % celkové radioaktivity a hodnota R_F se neodlišuje o více než 5 % od R_F hodnoty odpovídající neaktivnímu jodidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-125 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku. Použije se přístroj se scintilačním detektorem, např. s tenkým krystalem jodidu sodného, a nastaví se tak, aby příspěvek radioaktivity jodu-126 byl minimalizován.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Natrii iodidi[^{131}I] solutio

Roztok s jodidem[^{131}I] sodným

Je to roztok pro perorální podávání, který obsahuje jod-131 ve formě jodidu sodného. Obsahuje také thiosíran sodný nebo jinou redukující látku a může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Jod-131 je radioaktivní izotop jodu; může být získán ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Roztok obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Na jiné radionuklidy než jod-131 připadá nejvýše 0,1 % z celkové radioaktivity. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá jodu-131 ve formě jodidu. Způsob přípravy je zvolen tak, aby měrná aktivita nebyla menší než 185 GBq jodu-131 v miligramu jodu k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Jod-131 má poločas přeměny 8,04 dne a emituje záření beta a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Referenční roztok jodu-131 se získává od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-131 mají energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 7,0 až 10,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních radionuklidových nečistot. Jod-133 má poločas přeměny 20,8 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,530 MeV a 0,875 MeV. Jod-135 má poločas přeměny 6,55 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,527 MeV a 1,260 MeV. Na jod-131 připadá nejméně 99,9 % z celkové radioaktivity a na jod-133, jod-135 a ostatní radionuklidové nečistoty připadá nejvýše 0,1 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca.*

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* tak, aby radioaktivita odpovídala asi 20 000 impulzů/min na 10 µl. Přidá se stejný objem roztoku obsahujícího *jodid draselný R* (1 g/l), *jodičnan draselný R* (2 g/l) a *hydrogenuhličitan sodný R* (10 g/l) a promíchá se.
Porovnávací roztok (a). 0,1 g *jodidu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.
Porovnávací roztok (b). 0,2 g *jodičnanu draselného R* se rozpustí ve *vodě R* a zředí se jí na 10 ml.

Na pruh vhodného papíru 25 cm dlouhého se odděleně nanese 20 µl zkoušeného roztoku, 10 µl porovnávacího roztoku (a) a 10 µl porovnávacího roztoku (b) a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (10 + 30) po dráze 20 cm (asi 2 h). Papír se usuší na vzduchu a přiložením filtračních papírů nasycených *kyselinou octovou R* s *jodičnanem draselným R* a *kyselinou octovou R* s *jodidem draselným R* se stanoví polohy neaktivního jodidu draselného a jodičnanu draselného. Vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se ve skvrně odpovídající jodidu nachází nejméně 95 % z celkové radioaktivity a hodnota R_F se neodlišuje o více než 5 % od R_F hodnoty odpovídající neaktivnímu jodidu na chromatogramu porovnávacího roztoku (a).

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-131 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

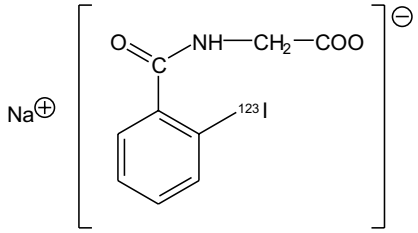
Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Natrii iodohippurati[^{123}I] solutio iniectabilis

Injekce s jodhippuranem[^{123}I] sodným



Je to sterilní roztok sodné soli kyseliny 2-(2-[^{123}I]jodbenzamido)octové. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok a vhodnou protimikrobní přísadu, jako je benzylalkohol. Jod-123 je radioaktivní izotop jodu; může se získávat ozařováním xenonu, obohaceného xenonem-124 (nejméně 98 %), protony a následnou přeměnou vzniklého cesia-123 přes xenon-123 na jod-123. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-123 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 96 % radioaktivity odpovídá jodu-123 ve formě jodhippuranu sodného. Měrná aktivita je 0,74 GBq až 10,0 GBq jodu-123 v gramu jodhippuranu sodného. Na jiné radionuklidy než jod-123 připadá nejvýše 0,35 % z celkové radioaktivity.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina.
Jod-123 má poločas přeměny 13,2 h a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-123 kromě rozdílů způsobených přítomností jodu-125, telluru-121 a jiných radionuklidových nečistot. Referenční roztoky jodu-123, jodu-125 a telluru-121 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-123 mají energii 0,159 MeV a jsou doprovázeny rtg-zářením o energii 0,027 MeV. Jod-125 má poločas přeměny 59,4 dne a emituje rtg-záření o energii 0,027 MeV a foton o energii 0,035 MeV. Tellur-121 má poločas přeměny 19,2 dne a nejvíce zastoupené fotony mají energie 0,507 MeV a 0,573 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Skvrna odpovídající hlavnímu píku radioaktivity na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou shoduje se skvrnou odpovídající kyselině 2-jodhippurové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 8,5.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Stanoví se relativní obsah jodu-125, telluru-121 a jiných přítomných radionuklidových nečistot. Nejsou detegovány jiné radionuklidy s delším poločasem přeměny, než je jod-125. Pro stanovení jodu-125, telluru-121 a jiných radionuklidových nečistot se zkoušený roztok ponechá dostatečně dlouhou dobu, aby radioaktivita jodu-123 klesla na nízkou hodnotu umožňující stanovení těchto nečistot. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření přeměněných radionuklidů způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Na jiné radionuklidy než jod-123 připadá nejvýše 0,35 % z celkové radioaktivity. Roztok se může použít před dokončením zkoušky.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R.*

Zkoušený roztok. 1 g *jodidu draselného R* se rozpustí v 10 ml *vody R*; připraví se směs objemových dílů tohoto roztoku a zkoušeného přípravku (1 + 10) a použije se do 10 min po smíchání. Pokud je to nutné, naředí se porovnávacím roztokem (nosičem) tak, aby koncentrace radioaktivity byla dostatečná pro detekční metodu, např. 3,7 MBq v mililitru.
Porovnávací roztok (nosič). 40 mg *kyseliny 2-jodhippurové R* a 40 mg *kyseliny 2-jodbenzoové R* se rozpustí ve 4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS*, přidá se 10 mg *jodidu draselného R* a zředí se *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, kyseliny octové ledové R, butanolu R* a *toluenu R* (1 + 4 + 20 + 80) po dráze 12 cm (asi 75 min). Vrstva se usuší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je skvrna odpovídající kyselině 2-jodhippurové a blíže k čelu rozpouštědla skvrna odpovídající kyselině 2-jodbenzoové. Jodidový iont zůstává blízko startu. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se nejméně 96 % z celkové radioaktivity nachází ve skvrně odpovídající kyselině 2-jodhippurové a nejvýše 2 % z celkové radioaktivity v některé ze skvrn odpovídajících kyselině 2-jodbenzoové a jodidovému iontu.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-123 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem, v chladu, za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

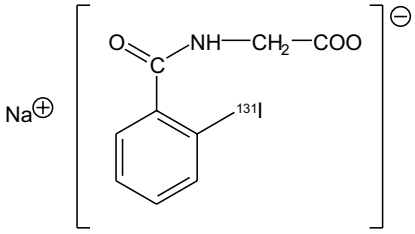
Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

V označení na obalu se uvede, zda přípravek je nebo není vhodný pro renální plazmaticko--průtokové studie.

Natrii iodohippurati[^{131}I] solutio iniectabilis

Injekce s jodhippuranem[^{131}I] sodným



Je to sterilní roztok sodné soli kyseliny 2-(2-[^{131}I]jodbenzamido)octové. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok a vhodnou protimikrobní přísadu, jako benzylalkohol. Jod-131 je radioaktivní izotop jodu; může být získán ozařováním telluru neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 96 % jodu-131 je ve formě jodhippuranu sodného. Měrná aktivita je 0,74 GBq až 7,4 GBq jodu-131 v gramu jodhippuranu sodného.

Vlastnosti

Čirá bezbarvá kapalina.

Jod-131 má poločas přeměny 8,04 dne a emituje záření beta a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Referenční roztok jodu-131 se získává od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-131 mají energii 0,365 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Skvrna odpovídající hlavnímu píku radioaktivity na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou shoduje se skvrnou odpovídající kyselině 2-jodhippurové na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 6,0 až 8,5.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních radionuklidových

nečistot. Jod-133 má poločas přeměny 20,8 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,530 MeV a 0,875 MeV. Jod-135 má poločas přeměny 6,55 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,527 MeV, 1,132 MeV a 1,260 MeV. Na jod-131 připadá nejméně 99,9 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití vrstvy *silikagelu GF_{254} R*.

Zkoušený roztok. 1 g *jodidu draselného R* se rozpustí v 10 ml *vody R*; připraví se směs objemových dílů tohoto roztoku a zkoušeného přípravku (1 + 10) a použije se do 10 min po smíchání. Pokud je to nutné, naředí se porovnávacím roztokem (nosičem) tak, aby koncentrace radioaktivity byla dostatečná pro detekční metodu, např. 3,7 MBq v mililitru.

Porovnávací roztok (nosič). 40 mg *kyseliny 2-jodhippurové R* a 40 mg *kyseliny 2-jodbenzoové R* se rozpustí ve 4 ml *hydroxidu sodného 0,1 mol/l RS*, přidá se 10 mg *jodidu draselného R* a zředí se *vodou R* na 10 ml.

Na vrstvu se odděleně nanese 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *vody R, kyseliny octové ledové R, butanolu R* a *toluenu R* (1 + 4 + 20 + 80) po dráze 12 cm (asi 75 min). Vrstva se usuší na vzduchu a pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm. Na chromatogramu porovnávacího roztoku je skvrna odpovídající kyselině 2-jodhippurové a blíže k čelu rozpouštědla skvrna odpovídající kyselině 2-jodbenzoové. Jodidový iont zůstává blízko startu. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Na chromatogramu zkoušeného roztoku se nejméně 96 % z celkové radioaktivity nachází ve skvrně odpovídající kyselině 2-jodhippurové a nejvýše 2 % z celkové radioaktivity v některé ze skvrn odpovídajících kyselině 2-jodbenzoové a jodidovému iontu.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-131 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem, v chladu, za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

V označení na obalu se uvede, že přípravek není vhodný pro renální plazmaticko-průtokové studie.

Natrii pertechnetatis[^{99m}Tc] fissione formati solutio iniectabilis

Injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpným produktem)

Článek se vztahuje na injekční roztok technecistanu[^{99m}Tc] sodného, který byl získán z molybdenu-99 extrahovaného ze štěpných produktů uranu. Injekční roztok technecistanu[^{99m}Tc] sodného, který byl získán z molybdenu-99 připraveného ozařováním molybdenu neutrony, je popsán v článku Injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (neštěpným produktem).

Je to sterilní roztok obsahující technecium-99m ve formě technecistanového iontu, izotonizovaný přídavkem chloridu sodného. Technecium-99m je radionuklid vzniklý přeměnou molybdenu-99. Molybden-99 je radioaktivní izotop molybdenu získaný extrakcí ze štěpných produktů uranu. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá techneciu-99m ve formě technecistanového iontu.

Radioaktivita, vyjádřená v procentech z celkové radioaktivity a vztažená k datu a hodině podání, příslušející jiným radionuklidům než techneciu-99m, kromě té, která vznikne při přeměně technecia-99m na technecium-99, není větší, než je uvedeno níže:

molybden-99	0,1 %
jod-131	$5 . 10^{-3}$ %
ruthenium-103	$5 . 10^{-3}$ %
stroncium-89	$6 . 10^{-5}$ %
stroncium-90	$6 . 10^{-6}$ %
nečistoty emitující záření alfa	$1 . 10^{-7}$ %
jiné radionuklidové nečistoty	0,01 %

Injekční roztok může být připraven ze sterilního přípravku molybdenu-99 za aseptických podmínek.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m, molybdenu-99, jodu-131, ruthenia-103, stroncia--89 a stroncia/yttria-90 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH. *(2.2.3).* 4,0 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Provede se podle článku *Radiofarmaca.*

Předběžná zkouška. Slouží k získání předběžného odhadu před použitím přípravku. Vezme se jeden objemový díl o radioaktivitě 37 MBq a zaznamená se spektrum záření gama za použití NaI detektoru, stíněného olovem o tloušťce 6 mm, umístěným mezi vzorkem a detektorem. Odezva v oblasti odpovídající fotonu molybdenu-99 o energii 0,740 MeV nepřevyšuje odezvu získanou za použití referenčního roztoku molybdenu-99 o radioaktivitě 37 kBq měřeného za stejných podmínek. Všechna měření se vztahují k datu a hodině podání.

Konečná zkouška. Přípravek se ponechá stát, aby se radioaktivita technecia-99m snížila na hodnotu umožňující detekci radionuklidových nečistot. Všechna měření radioaktivity se vztahují k datu a hodině podání.

Molybden-99. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku molybdenu-99. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,181 MeV, 0,740 MeV a 0,778 MeV. Molybdenu-99 s poločasem přeměny 66,0 h odpovídá nejvýše 0,1 % z celkové radioaktivity.

Jod-131. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku jodu-131. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,365 MeV. Jodu-131 s poločasem přeměny 8,04 dne odpovídá nejvýše $5 \cdot 10^{-3}$ % z celkové radioaktivity.

Ruthenium-103. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku ruthenia-103. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,497 MeV. Rutheniu-103 s poločasem přeměny 39,3 dne odpovídá nejvýše $5 \cdot 10^{-3}$ % z celkové radioaktivity.

Stroncium-89. Přítomnost stroncia-89 v přeměněné látce se stanoví vhodným přístrojem pro detekci záření beta porovnáním s referenčním roztokem stroncia-89. Obvykle je nutné nejprve provést chemickou separaci stroncia tak, aby referenční roztok a vzorek byly ve stejné fyzikální a chemické formě. Stronciu-89 s poločasem přeměny 50,5 dne, které emituje záření beta s maximální energií 1,492 MeV, odpovídá nejvýše $6 \cdot 10^{-5}$ % z celkové radioaktivity.

Stroncium-90. Přítomnost stroncia-90 v přeměněné látce se stanoví vhodným přístrojem pro detekci záření beta porovnáním s referenčním roztokem stroncia-90. Provede se chemická separace yttria-90, které je dceřiným nuklidem stroncia-90, a použije se k rozlišení stroncia-90 od stroncia-89 porovnáním radioaktivity yttria-90 s referenčním přípravkem yttria-90. Je-li nutná předcházející chemická separace stroncia, musí být zajištěna podmínka radioaktivní rovnováhy. Referenční přípravek yttria-90 a vzorek se porovnávají ve stejné fyzikální a chemické formě. Stroncium-90 a yttrium-90 se přeměňují za emise záření beta s maximálními energiemi 0,546 MeV a 2,284 MeV a mají poločasy přeměny 29,1 roku a 64,0 h. Stronciu-90 odpovídá nejvýše $6 \cdot 10^{-6}$ % z celkové radioaktivity.

Ostatní nečistoty emitující záření gama. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky, aby bylo možno stanovit přítomnost a množství ostatních radionuklidových nečistot. Celková radioaktivita gama ostatních radionuklidových nečistot představuje nejvýše 0,01 % z celkové radioaktivity.

Nečistoty emitující záření alfa. Změří se radioaktivita alfa přeměněné látky, aby bylo možno stanovit přítomnost a množství ostatních radionuklidových nečistot emitujících záření alfa. Celková radioaktivita alfa těchto nečistot představuje nejvýše $1 \cdot 10^{-7}$ % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se sestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca.*

Zkoušený roztok. Přípravek se zředí *vodou R* na vhodnou koncentraci radioaktivity.

Na papír se nanese 5 μl zkoušeného roztoku a 2 h se vyvíjí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80). Papír se usuší na vzduchu a vhodným detektorem se stanoví rozdělení

radioaktivity. Ve skvrně odpovídající technecistanovému iontu, která má R_F asi 0,6, se nachází nejméně 95 % z celkové radioaktivity.

Hliník. 1 ml zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* na 2,5 ml a ve zkumavce o průměru 12 mm se smíchají 2 ml tohoto roztoku s 1 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6.* Přidá se 0,05 ml roztoku *chromazurolu S R* (10 g/l). Po 3 min se tento roztok nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)* (5 μg/ml).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

Natrii pertechnetatis[^{99m}Tc] sine fissione formati solutio iniectabilis

Injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (neštěpným produktem)

Článek se vztahuje na injekční roztok technecistanu[^{99m}Tc] sodného, který byl získán z molybdenu-99 připraveného ozařováním molybdenu neutrony. Injekční roztok technecistanu[^{99m}Tc] sodného, který byl získán z molybdenu-99 extrahovaného ze štěpných produktů uranu, je popsán v článku Injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpným produktem).

Je to sterilní roztok obsahující technecium-99m ve formě technecistanového iontu, izotonizovaný chloridem sodným. Technecium-99m je radionuklid vzniklý přeměnou molybdenu-99. Molybden-99 je radioaktivní izotop molybdenu získaný ozařováním molybdenu neutrony. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá techneciu-99m ve formě technecistanového iontu.

Radioaktivita, vyjádřená v procentech z celkové radioaktivity a vztažená k datu a hodině podání, příslušející jiným radionuklidům než techneciu-99m, kromě té, která vznikne při přeměně technecia-99m na technecium-99, není větší, než je uvedeno níže:

molybden-99	0,1 %
ostatní radionuklidové nečistoty	0,01 %

Injekční roztok může být připraven ze sterilního přípravku molybdenu-99 za aseptických podmínek.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 4,0 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Provede se podle článku *Radiofarmaca.*

Předběžná zkouška. Slouží k získání předběžného odhadu před použitím přípravku. Vezme se 1 objemový díl o radioaktivitě 37 MBq a zaznamená se spektrum záření gama za použití NaI detektoru, stíněného olovem o tloušťce 6 mm, umístěným mezi vzorkem a detektorem. Odezva v oblasti odpovídající fotonům molybdenu-99 o energii 0,740 MeV nepřevyšuje odezvu k referenčnímu roztoku molybdenu-99 o radioaktivitě 37 kBq, měřeného za stejných podmínek. Všechna měření se vztahují k datu a hodině podání.

Konečná zkouška. Přípravek se ponechá stát, aby se radioaktivita technecia-99m snížila na hodnotu umožňující detekci radionuklidových nečistot. Všechna měření radioaktivity se vztahují k datu a hodině podání.

Molybden-99. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčního roztoku molybdenu-99. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,181 MeV, 0,740 MeV a 0,778 MeV. Molybdenu-99 s poločasem přeměny 66,0 h odpovídá nejvýše 0,1 % z celkové radioaktivity.

Ostatní nečistoty emitující záření gama. Zaznamená se spektrum záření gama přeměněné látky, aby bylo možno stanovit přítomnost a množství ostatních radionuklidových nečistot. Součet radioaktivity těchto nečistot představuje nejvýše 0,01 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota. Provede se sestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca.*

Zkoušený roztok. Přípravek se zředí *vodou R* na vhodnou koncentraci radioaktivity.

Na papír se nanese 5 μl zkoušeného roztoku a 2 h se vyvíjí směsí objemových dílů *vody R* a *methanolu R* (20 + 80). Papír se usuší na vzduchu a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Ve skvrně odpovídající technecistanovému iontu, která má R_F asi 0,6, se nachází nejméně 95 % z celkové radioaktivity.

Hliník. 1 ml zkoušeného přípravku se zředí *vodou R* na 2,5 ml a ve zkumavce o průměru 12 mm se smíchají 2 ml tohoto roztoku s 1 ml *tlumivého roztoku octanového o pH 4,6.* Přidá se 0,05 ml roztoku *chromazurolu S R* (10 g/l). Po 3 min se tento roztok nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 2 ml základního *roztoku hliníku (2 μg Al/ml)* (5 μg/ml).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca*.

Natrii phosphatis[^{32}P] solutio iniectabilis

Injekce s fosforečnanem[^{32}P] sodným

Je to sterilní roztok hydrogenfosforečnanu[^{32}P] sodného a dihydrogenfosforečnanu[^{32}P] sodného, izotonizovaný chloridem sodným. Fosfor-32 je radioaktivní izotop fosforu, který může být získán ozařováním síry neutrony. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity fosforu-32 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá fosforu-32 ve formě fosforečnanového iontu. Měrná aktivita není menší než 11,1 MBq fosforu-32 v miligramu fosforečnanového iontu.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Fosfor-32 má poločas přeměny 14,3 dne a emituje záření beta.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření beta nebo absorpční křivka záření beta způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum nebo křivka se významně neliší od spektra nebo křivky referenčního roztoku fosforu-32 získaných za stejných podmínek. Referenční roztok fosforu-32 se získává od národní laboratoře. Maximální energie záření beta je 1,71 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření beta nebo absorpční křivka záření beta způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum nebo křivka se významně neliší od spektra nebo křivky referenčního roztoku fosforu-32 získaných za stejných podmínek.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *vodou R* tak, aby radioaktivita odpovídala asi 10 000 až 20 000 impulzů/min na 10 µl.
Porovnávací roztok. Připraví se roztok *kyseliny fosforečné R* obsahující 2 mg fosforu v 1 ml.

Na pruh vhodného papíru 25 mm širokého a 300 mm dlouhého se nanese na stejné místo 10 µl porovnávacího roztoku a 10 µl zkoušeného roztoku a vyvíjí se směsí obsahující 0,3 ml *amoniaku R*, 5 g *kyseliny trichloroctové R*, 25 ml *vody R* a 75 ml *2-propanolu R* po dobu 16 h. Papír se usuší na vzduchu a stanoví se poloha neaktivní kyseliny fosforečné postřikem roztokem *kyseliny chloristé R* (50 g/l), pak roztokem *molybdenanu hexaamonného R* (10 g/l) a potom se vystaví působení *sirovodíku R*; vznikne modré zbarvení. Poloha radioaktivní skvrny se určí změřením radioaktivity po celé délce chromatogramu. Nejméně 95 % z celkové radioaktivity chromatogramu se nachází ve skvrně odpovídající kyselině fosforečné.

Fosforečnany. Přípravek se zředí *vodou R* tak, aby koncentrace radioaktivity byla 370 kBq fosforu-32 v mililitru, protřepe se v odměrné baňce a přidá se 1,0 ml roztoku obsahujícího směs 0,5 ml roztoku *vanadičnanu amonného R* (2,5 g/l), 0,5 ml *molybdenanu hexaamonného RS* a 1 ml *kyseliny chloristé R* a zředí se *vodou R* na 5,0 ml. Po 30 min se roztok nezbarví intenzivněji než porovnávací roztok připravený současně stejným způsobem za použití 1,0 ml roztoku obsahujícího 33 mg fosforečnanových iontů v litru.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca*. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem fosforu-32 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

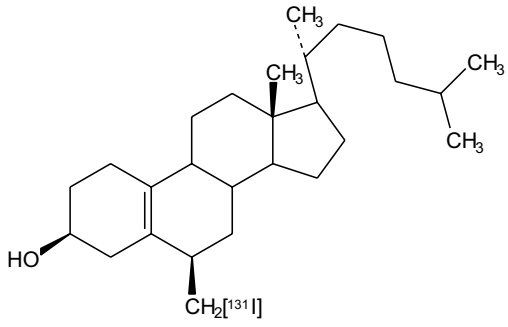
Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Norcholesteroli iodinati[^{131}I] solutio iniectabilis

Injekce s jodovaným[^{131}I] norcholesterolem



Je to sterilní roztok 6β-[^{131}I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-olu, prostý bakteriálních endotoxinů. Může obsahovat vhodný emulgátor, jako je polysorbát 80, a vhodnou protimikrobní přísadu, jako je benzylalkohol. Jod-131 je radioaktivní izotop jodu, který se získává ozařováním neutrony nebo extrakcí ze štěpných produktů uranu. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity jodu-131 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 85 % radioaktivity odpovídá jodu-131 ve formě 6β-[^{131}I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-olu. Nejvýše 5 % radioaktivity odpovídá jodu-131 ve formě jodidu. Měrná aktivita je 3,7 GBq až 37 GBq na gram 6β-jodmethylnorcholesterolu.

Vlastnosti

Čirý nebo slabě zakalený bezbarvý nebo nažloutlý roztok.
Jod-131 má poločas přeměny 8,04 dne a emituje záření beta a záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Nejvíce zastoupené fotony gama jodu-131 mají energii 0,365 MeV. Referenční roztok jodu-131 se získává od národní laboratoře.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 3,5 až 8,5.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku jodu-131. Stanoví se relativní obsah jodu-131, jodu-133, jodu-135 a ostatních radionuklidových nečistot. Jod-133 má poločas přeměny 20,8 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,530 MeV a 0,875 MeV. Jod-135 má poločas přeměny 6,55 h a nejvíce zastoupené fotony gama

mají energie 0,527 MeV, 1,132 MeV a 1,260 MeV. Na jod-131 připadá nejméně 99,9 % z celkové radioaktivity.

Radiochemická čistota.

a) Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27),* jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R.*

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok nosiče. 10 mg *jodidu draselného R,* 20 mg *jodičnanu draselného R* a 0,1 g *hydrogenuhličitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese na stejné místo 5 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku nosiče a vyvíjí se *chloroformem R* po dráze 15 cm (asi 60 min). Vrstva se usuší na vzduchu, pak se pozoruje v ultrafialovém světle při 254 nm a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Nejméně 85 % z celkové radioaktivity se nachází ve skvrně odpovídající 6β-[^{131}I]jodmethyl-19-norcholest-5(10)-en-3β-olu a má R_F asi 0,5. Jodidový iont zůstává v blízkosti startu.

b) Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití vrstvy *silikagelu GF$_{254}$ R.*

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek.
Porovnávací roztok nosiče. 10 mg *jodidu draselného R,* 20 mg *jodičnanu draselného R* a 0,1 g *hydrogenuhličitanu sodného R* se rozpustí ve *vodě destilované R* a zředí se jí na 10 ml.

Na vrstvu se nanese na stejné místo 5 μl zkoušeného roztoku a 10 μl porovnávacího roztoku nosiče a vyvíjí se směsí stejných objemových dílů *chloroformu R* a *ethanolu R* po dráze 15 cm (asi 90 min). Vrstva se usuší na vzduchu a pak se vystaví na 5 min ultrafialovému světlu při 254 nm. Žlutá skvrna odpovídající jodidu má R_F asi 0,5. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Hlavní pík radioaktivity se nachází v blízkosti čela rozpouštědla. Ostatní jodcholestero-ly se nacházejí v blízkosti čela. Na získaném chromatogramu se nejvýše 5 % z celkové radioaktivity nachází ve skvrně odpovídající jodidu.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14).* Nejvýše 175/*V* m.j. endotoxinu v mililitru, kde *V* je doporučená maximální dávka v mililitrech.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem jodu-131 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Chráněn před světlem, při teplotě nepřevyšující -18 °C, za podmínek uvedených v článku *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Rhenii sulfidi colloidalis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis

Injekce s koloidním sulfidem rhenistým značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní koloidní disperze sulfidu rhenistého prostá pyrogenních látek, jejíž micely jsou značené techneciem-99m; je stabilizována želatinou. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 92 % radioaktivity odpovídá techneciu-99m v koloidní formě. Hodnota pH přípravku může být upravena přidáním vhodného tlumivého roztoku, jako je tlumivý roztok citronanový. Přípravek obsahuje proměnlivé množství koloidního sulfidu rhenistého nepřevyšující 0,22 mg rhenia (Re) v mililitru, podle způsobu přípravy.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Světle hnědá kapalina.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupený foton gama technecia-99m má energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

C. K 1 ml se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 5 ml roztoku *thiomočoviny R* (50 g/l) a 1 ml roztoku *chloridu cínatého R* (200 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R;* vznikne žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 7,0.

Rhenium.

Zkoušený roztok. Použije se 1 ml zkoušeného přípravku.

Porovnávací roztoky. Připraví se vhodná řada roztoků za použití roztoku obsahujícího 100 μg *rhenistanu draselného R* (odpovídá 60 μg Re/ml) a 240 μg *thiosíranu sodného R* na mililitr a zředí se *vodou R* na stejný konečný objem.

Ke zkoušenému roztoku a k 1 ml každého porovnávacího roztoku se přidá 5 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 5 ml roztoku *thiomočoviny R* (50 g/l) a 1 ml roztoku *chloridu cínatého R* (200 g/l) v *kyselině chlorovodíkové R* a zředí se *vodou R* na 25,0 ml. Nechá se 40 min stát a změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 400 nm za použití kontrolního roztoku získaného ve

slepé zkoušce. Za použití absorbancí získaných z porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a vypočítá se obsah rhenia ve zkoušeném přípravku.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Na papír se nanese 10 μl zkoušeného přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm. Papír se nechá uschnout a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Technecium-99m v koloidní formě zůstává na startu a technecistanový iont má R_F asi 0,6. Mohou se objevit i jiné nečistoty s R_F 0,8 až 0,9. Radioaktivita odpovídající techneciu-99m v koloidní formě představuje nejméně 92 % z celkové radioaktivity chromatogramu.

Fyziologická distribuce. Každé ze tří myší vážících 20 g až 25 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml do vena caudalis. Po 20 min se myši usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným detektorem se změří radioaktivita orgánů, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*. Po odstranění ocasu se změří radioaktivita zbytku těla. Procento radioaktivity každého vyjmutého orgánu se stanoví ze vztahu:

$$\frac{A}{B} \cdot 100 ,$$

mv němž značí:

A - radioaktivitu jednotlivého orgánu,

B - celkovou radioaktivitu všech vyjmutých orgánů a zbytku těla bez ocasu.

U všech tří myší se nachází nejméně 80 % radioaktivity v játrech a slezině a nejvýše 5 % v plicích. Pokud rozdělení radioaktivity u jedné ze tří myší neodpovídá výše uvedenému požadavku, zkouška se zopakuje na dalších třech myších. Přípravek je vyhovující, pokud je předepsané rozdělení radioaktivity nalezeno u pěti ze šesti použitých myší. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Pyrogenní látky. Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Radiofarmaca*. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 0,1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se zvláště uvede množství rhenia v mililitru.

Stanni colloidalis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis

Injekce s koloidním cínem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní koloidní disperze cínu značená techneciem-99m. Přípravek obsahuje proměnné množství cínu nepřevyšující 1 mg Sn v mililitru; obsahuje fluoridové ionty, může být stabilizován vhodnou koloid chránící přísadou, prostou pyrogenních látek, a může obsahovat vhodný tlumivý roztok. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % radioaktivity odpovídá techneciu-99m v koloidní formě.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání. Injekční stříkačka používaná k manipulaci s eluátem určeným ke značení konečného produktu nebo pro manipulaci s konečným produktem by neměla obsahovat gumové části.

Vlastnosti

Čirá nebo opalizující bezbarvá kapalina.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. 0,05 ml *dusičnan-oxidu zirkoničitého RS* se smíchá s 0,05 ml *alizarinu S RS* a přidá se 0,05 ml zkoušeného přípravku; vznikne žluté zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 7,0.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu naneseného na vrstvě skleněných vláken. Deska se zahřívá 10 min při 110 °C, při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhne během 10 min 10 cm až 15 cm.

Nanese se 5 µl až 10 µl zkoušeného přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) čištěného *dusíkem R* po dráze 10 cm až 15 cm. Vrstva se nechá usušit a rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Technecium-99m v koloidní formě zůstane na startu a technecistanový iont se pohybuje v blízkosti čela rozpouštědla. Nejméně 95,0 % radioaktivity technecia-99m odpovídá techneciu v koloidní formě.

Cín.

Zkoušený roztok. 3,0 ml se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolního roztoku. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (1 mg Sn v mililitru).

Fyziologická distribuce. Každé ze tří myší vážících 20 g až 25 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml do vena caudalis. Po 20 min se myši usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným detektorem se změří radioaktivita orgánů, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*. Po odstranění ocasu se změří radioaktivita zbytku těla. Stanoví se procenta radioaktivity v játrech, ve slezině a v plicích vzhledem k celkové radioaktivitě všech orgánů a zbytku těla kromě ocasu.

U všech tří myší se nachází nejméně 80 % radioaktivity v játrech a ve slezině a nejvýše 5 % v plicích. Pokud rozdělení radioaktivity u jedné ze tří myší neodpovídá výše uvedenému požadavku, zkouška se zopakuje na dalších třech myších. Přípravek je vyhovující, pokud je předepsané rozdělení radioaktivity nalezeno u pěti ze šesti použitých myší.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Stanni pyrophosphatis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis

Injekce s komplexem difosforečnanu a cínu značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok prostý pyrogenních látek, který může být připraven smícháním roztoků difosforečnanu sodného a chloridu cínatého s injekcí technecistanu[^{99m}Tc] sodného (štěpný nebo neštěpný produkt). Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 90 % radioaktivity odpovídá komplexu difosforečnanu a cínu s techneciem-99m. Přípravek obsahuje difosforečnan sodný ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) v množství 1 mg až 50 mg v mililitru a proměnné množství cínu (Sn) nepřevyšující 3,0 mg v mililitru.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

C. K 1 ml se přidá 1 ml *kyseliny octové R* a zahřívá se 1 h ve vodní lázni. Po ochlazení se přidá 10 ml *zkoumadla molybdenan-vanadičného R2* a nechá se 30 min stát; vznikne žluté zbarvení.

D. K 1 ml se přidají 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* (30% *V/V*), 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l) a 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a nechá se 30 min stát; vznikne růžové zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 7,0.

Radiochemická čistota.

a) Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Vrstva se 10 min zahřívá při 110 °C. Použije se taková vrstva, aby při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhlo během 10 min 10 cm až 15 cm.

Na vrstvu se nanese 5 µl až 10 µl přípravku a usuší se v proudu dusíku. Vyvíjí se *2-butanonem R*, kterým těsně před použitím 10 min probublává dusík, po dráze 10 cm až 15 cm a nechá se usušit. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Komplex difosforečnanu a cínu s techneciem-99m zůstává na startu a technecistanový iont má hodnotu R_F 0,95 až 1,0.

b) Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Deska se 10 min zahřívá při 110 °C. Použije se taková vrstva, aby při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhlo během 10 min 10 cm až 15 cm.

Na vrstvu se nanese 5 µl až 10 µl přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *octanu sodného R* (136 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm a nechá se usušit. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Nečistoty v koloidní formě zůstávají na startu a komplex difosforečnanu a cínu s techneciem-99m má hodnotu R_F 0,9 až 1,0.

Součet procent radioaktivity odpovídající nečistotám na chromatogramech získaných ve zkouškách (a) a (b) není větší než 10 %.

Difosforečnan sodný.

Zkoušený roztok. 1 ml zkoušeného přípravku nebo jeho vhodné zředění.
Porovnávací roztoky. Připraví se řada roztoků za použití roztoku obsahujícího *difosforečnan sodný R* a *chlorid cínatý R* ve stejném poměru jako ve zkoušeném přípravku a doplní se *vodou R* na konečný objem.

Ke zkoušenému roztoku a k 1 ml každého porovnávacího roztoku se postupně přidá 10 ml roztoku *hydrogenfosforečnanu sodného R* (1 g/l), 10 ml základního *roztoku železa (8 μg Fe/ml)*, 5 ml *kyseliny octové ledové R* a 5 ml roztoku *hydroxylamoniumchloridu R* (1 g/l).

Všechny roztoky se doplní *vodou R* na 40 ml a zahřívají se 1 h ve vodní lázni při 40 °C. Ke každému roztoku se přidají 4 ml roztoku *fenanthroliniumchloridu R* (1 g/l) a zředí se *vodou R* na 50,0 ml.

Změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 515 nm za použití kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce, obsahujícího kyselinu chlorovodíkovou (1,1 g/l HCl) místo základního *roztoku železa (8 μg Fe/ml)*. Ze získaných absorbancí porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a vypočítá se obsah difosforečnanu sodného v přípravku.

Cín.

Zkoušený roztok. 1 ml zkoušeného přípravku nebo jeho vhodné zředění.

Porovnávací roztoky. Připraví se řada roztoků za použití roztoku *difosforečnanu sodného R* a *chloridu cínatého R* v *kyselině chlorovodíkové R* (6,2 g/l HCl) ve stejném poměru jako ve zkoušeném přípravku a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou R* (6,2 g/l HCl) na stejný objem.

Ke zkoušenému roztoku a k 1,0 ml každého porovnávacího roztoku se přidají 2 ml roztoku *kyseliny sírové R* (300 g/l), 1 ml *kyseliny chlorovodíkové R*, 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l) a 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a zředí se *kyselinou chlorovodíkovou R* (6,2 g/l HCl) na 15 ml. Roztoky se nechají 30 min stát a změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 530 nm za použití kontrolního roztoku získaného při slepé zkoušce, obsahujícího stejné množství *difosforečnanu sodného R* jako zkoušený přípravek. Ze získaných absorbancí porovnávacích roztoků se sestaví kalibrační křivka a vypočítá se obsah cínu v přípravku.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Pyrogenní látky. Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Radiofarmaca*. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 0,1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede množství difosforečnanu sodného v mililitru a množství cínu v mililitru.

Sulfuris colloidalis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis

Injekce s koloidní sírou značenou techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní koloidní disperze síry prostá pyrogenních látek, jejíž micely jsou značené techneciem-99m. Může být stabilizována složkou na bázi želatiny, která chrání koloid. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 92 % radioaktivity odpovídá techneciu-99m v koloidní formě. Hodnota pH může být upravena přidáním vhodného tlumivého roztoku, jako je tlumivý roztok octanový, citronanový nebo fosforečnanový. Přípravek obsahuje proměnné množství koloidní síry, podle způsobu přípravy.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Čirá až opalizující, bezbarvá až nažloutlá kapalina.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

C. Ve zkumavce o délce 100 mm a vnitřním průměru 16 mm se do sucha odpaří 0,2 ml přípravku. Síra se rozpustí třepáním zbytku s 0,2 ml *pyridinu R* a přidá se asi 20 mg *benzoinu R*. Hrdlo zkumavky se přikryje filtračním papírem navlhčeným *octanem olovnatým RS* a zkumavka se zahřívá v glycerinové lázni při 150 °C; papír pomalu zhnědne.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 7,0.

Radiochemická čistota. Provede se vzestupná papírová chromatografie *(2.2.26)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*.

Na papír se nanese 10 μl přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm a nechá se usušit. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Technecium-99m v koloidní formě zůstává na startu a technecistanový iont má hodnotu R_F 0,6. Mohou se vyskytovat jiné nečistoty s R_F 0,8 až 0,9. Radioaktivita odpovídající techneciu-99m v koloidní formě představuje nejméně 92 % z celkové radioaktivity chromatogramu.

Fyziologická distribuce. Každé ze tří myší vážících 20 g až 25 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml do vena caudalis. Po 20 min se myši usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným detektorem se změří radioaktivita orgánů, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Odstraní se ocas a změří se

radioaktivita zbytku těla. Procenta radioaktivity v játrech, ve slezině a v plicích se stanoví ze vztahu:

$$\frac{A}{B} \cdot 100 ,$$

v němž značí:
A - radioaktivitu jednotlivého orgánu,
B - celkovou radioaktivitu jater, sleziny, plic a zbytku těla.

U každé ze tří myší se nejméně 80 % radioaktivity nachází v játrech a ve slezině a nejvýše 5 % v plicích. Pokud rozdělení radioaktivity u jedné ze tří myší neodpovídá výše uvedeným požadavkům, zkouška se opakuje na dalších třech myších. Přípravek vyhovuje zkoušce, pokud je předepsané rozdělení radioaktivity nalezeno u pěti ~~z~~e šesti použitých myší. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Pyrogenní látky. Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Radiofarmaca*. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 0,1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Technetii[^{99m}Tc] et etifenini solutio iniectabilis

Injekce s etifeninem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok, který může být připraven smícháním injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) s roztokem etifeninu [N-(2,6-diethylfenylkarbamoylmethyl)iminodioctová kyselina; $C_{16}H_{22}N_2O_5$] a s roztokem chloridu cínatého. Přípravek obsahuje proměnné množství cínu (Sn) nepřevyšující 0,2 mg v mililitru. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95,0 % radioaktivity odpovídá komplexu etifeninu s techneciem-99m.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Provede se kapalinová chromatografie *(2.2.29)*.

Zkoušený roztok. Zkoušený přípravek se zředí *methanolem R* tak, aby získaný roztok obsahoval asi 1 mg etifeninu v mililitru.

Porovnávací roztok. 5,0 mg *etifeninu CRL* se rozpustí v *methanolu R* a zředí se jím na 5,0 ml.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:
- kolony délky 0,25 m a vnitřního průměru 4,6 mm naplněné *silikagelem oktadecylsilanizovaným pro chromatografii R* (5 μm až 10 μm),
- mobilní fáze, která je směsí objemových dílů *methanolu R* a roztoku *dihydrogenfosforečnanu draselného R* (14 g/l) (20 + 80), jejíž pH bylo upraveno na 2,5 *kyselinou fosforečnou R*. Průtoková rychlost je 1,0 ml/min,
- spektrofotometrického detektoru, 230 nm.

Nastříkne se po 20 μl každého roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku je retenční čas hlavního píku shodný s retenčním časem hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH. *(2.2.3)*. 4,0 až 6,0.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca,* za použití kyseliny křemičité na vrstvě skleněných vláken. Deska se zahřívá 10 min při 110 °C, při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhne během 15 min 10 cm až 15 cm.

Nanese se 5 μl až 10 μl zkoušeného přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm. Vrstva se nechá usušit a rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Komplex etifeninu s techneciem-99m se pohybuje téměř ve středu chromatogramu, technecistanový iont se pohybuje s čelem rozpouštědla a nečistoty v koloidní formě zůstávají na startu. Komplexu etifeninu s techneciem-99m odpovídá nejméně 95,0 % z celkové radioaktivity chromatogramu.

Fyziologická distribuce. Každé ze tří myší vážících 20 g až 25 g se vstříkne 0,1 ml (odpovídá asi 3,7 MBq) do vena caudalis. Po 1 h se myši usmrtí, vyjmou se játra, žlučník, tenké střevo, tlusté střevo a ledviny, sebere se vyloučená moč. Radioaktivita orgánů se změří vhodným detektorem, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Po odstranění ocasu se změří radioaktivita zbytku těla. Procenta radioaktivity v každém orgánu se stanoví ze vztahu:

$$\frac{A}{B} \cdot 100 ,$$

v němž značí:
A - radioaktivitu jednotlivého orgánu,
B - radioaktivitu všech orgánů a zbytku těla bez ocasu.

Nejméně u dvou myší není součet procent radioaktivity ve žlučníku, v tenkém střevě a v tlustém střevě menší než 80 %. Nejvýše 3 % radioaktivity se nachází v játrech a nejvýše 2 % v ledvinách.

Cín.

Zkoušený roztok. 1,0 ml se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 5,0 ml.
Porovnávací roztok. Připraví se za použití *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS* tak, aby roztok obsahoval 0,075 mg *chloridu cínatého R* v mililitru.

K 1 ml každého roztoku se přidá 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolního roztoku. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (0,2 mg Sn v mililitru).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Technetii[^{99m}Tc] gluconatis solutio iniectabilis

Injekce s glukonanem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok, který může být připraven smícháním roztoků glukonanu vápenatého a cínaté soli nebo jiné vhodné redukující látky s injekcí technecistanu[^{99m}Tc] sodného (štěpného nebo neštěpného produktu). Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 90 % radioaktivity odpovídá komplexu glukonanu s techneciem-99m.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Slabě opalizující roztok.
Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. 5 μl roztoku vyhovuje zkoušce totožnosti A popsané v článku *Calcii gluconas*.

C. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 6,0 až 8,5.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Deska se 10 min zahřívá při 110 °C. Použije se taková vrstva, aby při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhlo během 10 min 10 cm až 15 cm.

a) Na vrstvu se nanese 5 μl až 10 μl přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm, nechá se usušit a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Nečistoty v koloidní formě zůstávají na startu, komplex glukonanu s techneciem a technecistanový iont jsou v blízkosti čela rozpouštědla.

b) Na vrstvu se nanese 5 μl až 10 μl přípravku, nechá se usušit, vyvíjí se *2-butanonem R* po dráze 10 cm až 15 cm a pak se usuší v proudu teplého vzduchu. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Technecistanový iont (nečistota) je v blízkosti čela rozpouštědla, komplex glukonanu s techneciem a technecium v koloidní formě zůstávají na startu.

Součet procent radioaktivity odpovídající nečistotám na chromatogramech získaných ve zkouškách (a) a (b) není větší než 10 %.

Fyziologická distribuce. Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml do vena caudalis. Změří se radioaktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 30 min se potkani usmrtí, vhodným způsobem se odebere nejméně 1 g krve, vyjmou se ledviny, játra, močový měchýř se zadrženou močí a ocas. Zváží se vzorek krve.

Vhodným přístrojem se stanoví radioaktivita orgánů, vzorku krve a ocasu, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Stanoví se procenta radioaktivity v každém orgánu a v 1 g krve vztažená k celkové radioaktivitě (vypočítané jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání a odečte se aktivita ocasu). Hodnota radioaktivity v krvi se vynásobí faktorem $m/200$, kde m je hmotnost těla potkana v gramech.

Nejméně u dvou ze tří potkanů je radioaktivita v ledvinách nejméně 15 %, v močovém měchýři se zadrženou močí nejméně 20 %, v játrech nejvýše 5 %. Radioaktivita v krvi po korekci je nejvýše 0,50 %.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Technetii[^{99m}Tc] humani albumini solutio iniectabilis

Injekce s lidským albuminem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok lidského albuminu značeného techneciem-99m prostý pyrogenních látek. Obsahuje redukující látku, jako je sůl cínu, v množství nepřevyšujícím 1 mg Sn v mililitru, může obsahovat vhodný tlumivý roztok a protimikrobní přísadu. Ačkoli v současné době není přesně určena hodnota pro maximální limit cínu, doporučuje se dodržovat co nejmenší poměr cínu k albuminu. Použitý lidský albumin vyhovuje požadavkům článku *Albumini humani solutio.* Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % množství albuminu uvedeného v označení. Nejméně 80 % radioaktivity přísluší albuminovým frakcím II až V. Nejvýše 5,0 % radioaktivity technecia-99m odpovídá volnému technecistanu; stanoveno metodou popsanou ve zkoušce Radiochemická čistota.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo světle žlutý roztok.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Provedou se precipitační zkoušky na zkoušeném přípravku s vhodným rozsahem druhově specifických antisér. Zkouška se provádí za použití antiséra specifického proti plazmatickým bílkovinám všech druhů domácích zvířat obvykle používaných v příslušné zemi k přípravě látek

biologického původu. Přípravek obsahuje bílkoviny lidského původu a dává negativní reakce se specifickými antiséry proti plazmatickým bílkovinám jiných druhů.

C. Provede se vhodnou imunoelektroforetickou technikou. Za použití antiséra proti normálnímu lidskému séru se porovná normální lidské sérum a zkoušený přípravek, je-li třeba, se zředí. Hlavní složka zkoušeného přípravku odpovídá hlavní složce normálního lidského séra. Ve zředěném roztoku mohou být nalezena malá množství jiných plazmatických bílkovin.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,0 až 6,5.

Radiochemická čistota.

a) Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Deska se zahřívá 10 min při 110 °C, při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhne během 10 min 10 cm až 15 cm.

Nanese se 5 µl až 10 µl zkoušeného přípravku a nechá se usušit. Vrstva se vyvíjí *2-butanonem R* po dráze 10 cm až 15 cm, nechá se usušit a rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Komplex lidského albuminu s techneciem-99m zůstává na startu a technecistanový iont se pohybuje s čelem rozpouštědla. Nejvýše 5,0 % radioaktivity technecia-99m odpovídá techneciu ve formě technecistanového iontu.

b) Provede se vylučovací chromatografie *(2.2.30)*.

Mobilní fáze (koncentrovaná). 1,124 g *dihydrogenfosforečnanu sodného R*, 4,210 g *hydrogenfosforečnanu sodného R*, 1,17 g *chloridu sodného R* a 0,10 g *azidu sodného R* se rozpustí ve 100 ml *vody R*.

Zkoušený roztok. 0,25 ml zkoušeného přípravku se smíchá s 0,25 ml mobilní fáze (koncentrované). Použije se ihned po zředění.

Chromatografický postup se obvykle provádí za použití:

- nerezové ocelové kolony délky 0,6 m a vnitřního průměru 7,5 mm naplněné *silikagelem pro vylučovací chromatografii R*,
- mobilní fáze, která je směsí stejných objemových dílů mobilní fáze (koncentrované) a *vody R*. Průtoková rychlost je 0,6 ml/min,
- detektoru radioaktivity nastaveného na technecium-99m,
- injektorové smyčky.

Nastříkne se 200 µl zkoušeného roztoku. Chromatogram se vyvíjí ještě nejméně 10 min po dosažení hodnoty pozadí.

Píky jsou eluovány s následujícími retenčními časy:

1.	sloučenina s vysokou molekulovou hmotností	19 až 20 min
2.	poly III-albumin	23 až 24 min
3.	poly II-albumin	25 až 27 min
4.	poly I-albumin	28 až 29 min
5.	albumin lidského séra	32 až 33 min
6	koloid cínu	40 až 47 min
7.	technecistan	48 min

Nejméně 80 % radioaktivity nanesené do kolony náleží albuminovým frakcím II až V.

Albumin.

Porovnávací roztok. Roztok *albuminu lidského R* se zředí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) tak, aby obsah albuminu byl 5 mg/ml.

K 1,0 ml zkoušeného přípravku a k 1,0 ml porovnávacího roztoku se přidají 4,0 ml *zkoumadla biuretového R* a promíchá se. Přesně po 30 min se změří absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) jako kontrolní kapaliny připraveného stejným způsobem. Z naměřených absorbancí se vypočítá obsah albuminu ve zkoušeném přípravku v mg/ml.

Cín.

Zkoušený roztok. K 1,0 ml zkoušeného přípravku se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 2 mol/l RS* a zahřívá se 30 min ve vodní lázni při 100 °C. Ochladí se a odstřeďuje se 10 min při 300 *g*. 1,0 ml supernatantní tekutiny se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 10 ml.
Porovnávací roztok. 95 mg *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidají 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolního roztoku. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (1 mg Sn v mililitru).

Fyziologická distribuce. Každému ze tří samců potkana vážících 150 g až 250 g se vstříkne nejvýše 0,5 ml, neobsahující více než 1,0 mg albuminu, do vhodné žíly, jako je vena caudalis nebo vena saphena. Změří se radioaktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 30 min se potkani usmrtí, vhodným způsobem se odebere 1 ml krve, vyjmou se játra, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odstraní se ocas. Vhodným přístrojem se stanoví radioaktivita 1 ml krve, jater, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocasu, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Stanoví se procenta radioaktivity v játrech a v 1 ml krve vztažená k celkové radioaktivitě (vypočítané jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odečte se i aktivita ocasu). Obsah radioaktivity v krvi se vynásobí faktorem *m*/200, kde *m* je hmotnost těla potkana v gramech. Nejméně u dvou ze tří použitých potkanů radioaktivita v játrech není větší než 15 % a v krvi po korekci není menší než 3,5 %.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Bakteriální endotoxiny *(2.6.14)*. Nejvýše 175/*V* m.j. endotoxinu v mililitru, kde *V* je doporučená maximální dávka v mililitrech.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede:

- množství albuminu,
- množství cínu, pokud ho přípravek obsahuje.

Technetii[^{99m}Tc] macrosalbi suspensio iniectabilis

Injekce s makrosalbem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní suspenze lidského albuminu prostá pyrogenních látek ve formě nepravidelných nerozpustných agregátů získaných denaturací lidského albuminu ve vodném roztoku; částice jsou značené techneciem-99m. Přípravek obsahuje redukující složky, jako jsou soli cínu, v množství nepřevyšujícím 3 mg Sn v mililitru. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok, jako je tlumivý roztok octanový, citronanový nebo fosforečnanový, nedenaturovaný lidský albumin a protimikrobní přísadu, jako je benzylalkohol. Použitý lidský albumin vyhovuje požadavkům článku *Albumini humani solutio*. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 90 % technecia-99m je vázáno na částice suspenze, jak je stanoveno ve zkoušce Nefiltrovatelná radioaktivita. Částice mají obvykle průměr 10 µm až 100 µm. Měrná aktivita není menší než 37 MBq technecia-99m v miligramu agregovaného albuminu k datu a hodině podání.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Bílá suspenze, která se stáním může rozdělit.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Zkoušky Nefiltrovatelná radioaktivita a Velikost částic jsou zároveň zkouškami totožnosti přípravku.

C. 1 ml přípravku se umístí do odstřeďovací zkumavky a odstřeďuje se 5 min až 10 min při 2500 *g*. Supernatantní kapalina se odstraní a ke zbytku se přidá 5 ml *vínanu měďnatého RS2*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Je-li třeba, zahřívá se do rozpuštění částic a po ochlazení se rychle přidá 0,5 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového RS* a ihned se promíchá; vznikne modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,8 až 7,5.

Nefiltrovatelná radioaktivita. Použije se polykarbonátový membránový filtr o průměru 13 mm až 25 mm, tloušťce 10 µm a s kulatými póry o průměru 3 µm, upevněný do vhodného držáku. Na filtr se nanese 0,2 ml přípravku a během filtrace se přidá 20 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Radioaktivita na filtru je nejméně 90 % z celkové radioaktivity zkoušeného přípravku.

Velikost částic. Hodnotí se za použití mikroskopu. Pokud je to nutné, přípravek se zředí tak, aby počet částic byl dostatečně nízký pro jejich rozlišení. Použije se stříkačka s jehlou o průměru nejméně 0,35 mm, potřebné množství se umístí do vhodného zařízení, jako je hemocytometrická komůrka; komůrka nemá být přeplněna. Suspenze se nechá 1 min stát a pak se opatrně přikryje krycím sklíčkem bez stlačení vzorku. Hodnotí se nejméně 5000 částic. Nejvýše 10 částic má maximální rozměr větší než 100 µm, žádná částice nemá maximální rozměr větší než 150 µm.

Agregovaný albumin.

Zkoušený roztok. Objem přípravku o předpokládaném obsahu asi 1 mg agregovaného albuminu se přenese do odstřeďovací zkumavky, 5 min až 10 min se odstřeďuje při asi 2500 *g* a pak se supernatantní kapalina odstraní. Sediment se resuspenduje ve 2,0 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), odstřeďuje se 5 min až 10 min při 2500 *g* a supernatantní kapalina se odstraní. Sediment se znovu resuspenduje v 5,0 ml *uhličitanu sodného RS1* a zahřívá se ve vodní lázni při 80 °C až 90 °C do rozpuštění agregovaného albuminu. Po ochlazení se převede do odměrné baňky a zředí se *uhličitanem sodným RS1* na 10,0 ml.

Porovnávací roztoky. Připraví se řada porovnávacích roztoků obsahujících 0,05 mg až 0,2 mg lidského albuminu v mililitru za použití *uhličitanu sodného RS1*.

3,0 ml každého roztoku se odděleně převedou do 25ml baněk. Do každé baňky se přidá 15,0 ml *vínanu měďnatého RS2*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Pak se rychle přidá 1,5 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového RS*, ihned se promíchá a nechá se 30 min stát. Změří se absorbance *(2.2.25)* při 750 nm za použití *uhličitanu sodného RS1* jako kontrolní kapaliny. Za použití absorbancí porovnávacích roztoků se sestrojí kalibrační křivka a vypočítá se obsah agregovaného albuminu v přípravku.

Cín.

Zkoušený roztok. K 1,0 ml přípravku se přidá 1,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 2 mol/l RS* a zahřívá se 30 min ve vodní lázni. Ochladí se a 10 min se odstřeďuje při 300 *g*. 1,0 ml supernatantní kapaliny se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 25,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (3 mg Sn v mililitru).

Fyziologická distribuce. Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml do vena caudalis. Po 15 min se potkani usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným přístrojem se změří radioaktivita orgánů, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Odstraní se ocas a změří se radioaktivita zbytku těla, včetně krve. Procenta radioaktivity v plicích, v játrech a ve slezině se stanoví ze vztahu:

$$\frac{A}{B} \cdot 100 ,$$

v němž značí:
A - radioaktivitu jednotlivého orgánu,
B - celkovou radioaktivitu jater, sleziny, plic a zbytku těla.

Nejméně u dvou ze tří potkanů je alespoň 80 % radioaktivity nalezeno v plicích a nejvýše 5 % v játrech a ve slezině. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky. —

Pyrogenní látky. Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Radiofarmaca*. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 0,1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede:
- že přípravek se má před použitím protřepat,
- množství cínu v mililitru, pokud ho přípravek obsahuje,
- že přípravek se nesmí použít, pokud po protřepání není suspenze homogenní.

Technetii[^{99m}Tc] medronati solutio iniectabilis

1998

Injekce s medronatem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok, který může být připraven smícháním roztoků methylendifosfonatu sodného a cínaté soli s injekcí s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt). Přípravek obsahuje proměnné množství cínu (Sn) nepřevyšující 3 mg v mililitru. Může obsahovat protimikrobní přísady, antioxidanty, stabilizátory a tlumivé roztoky. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Radioaktivita odpovídající jiným chemickým formám, než je komplex medronatu s techneciem-99m, není větší než 5,0 % z celkové radioaktivity.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti.

C. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je uvedeno v článku *Radiofarmaca,* za použití vrstvy celulosy.

Zkoušený roztok. Přípravek se zředí *vodou R* tak, aby získaný roztok obsahoval asi 0,1 mg až 0,5 mg medronatu sodného v mililitru.
Porovnávací roztok. Vhodné množství (1 mg až 5 mg) *kyseliny medronatové CRL* se rozpustí ve směsi roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l) a *vody R* a zředí se na 10 ml tak, aby se získaný roztok shodoval se zkoušeným roztokem v obsahu medronatu a chloridu sodného.

Na vrstvu se odděleně nanese 10 μl každého roztoku a vyvíjí se směsí objemových dílů *2-propanolu R*, *kyseliny chlorovodíkové 1 mol/l RS*, a *2-butanonu R* (20 + 30 + 60) po dráze 12 cm až 14 cm (asi 4 h). Vrstva se usuší na vzduchu, postříká se *molybdenanem hexaamonným RS4* a pak se asi na 10 min vystaví působení ultrafialového světla při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku se polohou a barvou shoduje se skvrnou na chromatogramu porovnávacího roztoku.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 3,5 až 7,5.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Použijí se takové vrstvy, aby při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhlo během 10 min 10 cm až 15 cm. Zkouškou (a) se stanoví hydrolyzované technecium a technecium v koloidní formě a zkouškou (b) se stanoví technecistanový iont.

a) Nanese se 5 μl až 10 μl přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *octanu sodného R* (136 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm, usuší se na vzduchu. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detektorem. Hydrolyzované technecium a technecium v koloidní formě zůstávají na startu a komplex medronatu s techneciem a technecistanový iont se pohybují v blízkosti čela rozpouštědla.

b) Na vrstvu se nanese 5 μl až 10 μl přípravku, rychle se usuší, vyvíjí se *2-butanonem R* po dráze 10 cm až 15 cm a nechá se uschnout. Rozdělení radioaktivity se stanoví vhodným detekto-

rem. Technecistanový iont se pohybuje v blízkosti čela rozpouštědla. Komplex medronatu s techneciem a technecium v koloidní formě zůstávají na startu.

Procento radioaktivity odpovídající technecistanovému iontu na chromatogramu získanému ve zkoušce (b) není větší než 2,0 % a součet procent radioaktivity odpovídající nečistotám na chromatogramech získaných ve zkouškách (a) a (b) (včetně technecistanového iontu) není větší než 5,0 %.

Cín.

Zkoušený roztok. 1,0 ml zkoušeného přípravku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 50,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Měří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (3 mg Sn v mililitru).

Fyziologická distribuce. Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml, neobsahující více než 0,05 mg medronatu sodného, do vhodné žíly, jako je vena caudalis nebo vena saphena. Změří se radioaktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 2 h se potkani usmrtí, vyjme se jedna stehenní kost, játra a část krve; krev se zváží. Pokud byla injekce podána do vena caudalis, odstraní se ocas. Vhodným přístrojem se stanoví radioaktivita stehenních kostí, jater, krve, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocasu, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Procenta radioaktivity v každém orgánu se stanoví ze vztahu:

$$\frac{A}{B} \cdot 100 ,$$

v němž značí:

A - radioaktivitu jednotlivého orgánu,

B - celkovou radioaktivitu (vypočítanou jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odečte se i aktivita ocasu).

Vypočítá se radioaktivita krve na jednotku hmotnosti a upraví se vynásobením faktorem *m*/200, v němž *m* je hmotnost těla potkana v gramech. Nejméně u dvou ze tří potkanů se nachází nejméně 1,5 % radioaktivity ve stehenní kosti, nejvýše 1,0 % v játrech, nejvýše 0,05 % v krvi (vztaženo k 1 g krve).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Technetii[^{99m}Tc] microsphaerarum suspensio iniectabilis

Injekce s mikročásticemi značenými techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní suspenze lidského albuminu prostá pyrogenních látek, denaturovaná za účelem vytvoření kulovitých nerozpustných částic značených techneciem-99m. Přípravek obsahuje redukující složky, jako jsou soli cínu, v množství nepřevyšujícím 3 mg Sn v mililitru. Může obsahovat vhodný tlumivý roztok, jako je tlumivý roztok octanový, citronanový nebo fosforečnanový, a přísady, jako jsou smáčedla. Použitý lidský albumin vyhovuje článku *Albumini humani solutio*. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95 % technecia-99m je vázáno na částice suspenze, jak je stanoveno ve zkoušce Nefiltrovatelná radioaktivita. Částice mají obvykle průměr 10 µm až 50 µm. Radioaktivita není menší než 185 MBq technecia-99m na milion částic k datu a hodině podání.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Suspenze bílých, žlutých nebo uměle obarvených částic, která se stáním může rozdělit.
Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Zkoušky Nefiltrovatelná radioaktivita a Velikost částic jsou zároveň zkouškami totožnosti přípravku.

C. 1 ml přípravku se umístí do odstřeďovací zkumavky a odstřeďuje se 5 min až 10 min při 2500 *g*. Supernatantní kapalina se odstraní a ke zbytku se přidá 5 ml *vínanu měďnatého RS2*, promíchá se a nechá se 10 min stát. Je-li třeba, zahřívá se do rozpuštění částic a po ochlazení se rychle přidá 0,5 ml *zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového zředěného R*, ihned se promíchá a nechá se stát; vznikne modré zbarvení.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 9,0.

Nefiltrovatelná radioaktivita. Použije se polykarbonátový membránový filtr o průměru 13 mm až 25 mm, tloušťce 10 µm a s kulatými póry o průměru 3 µm, upevněný do vhodného držáku. Na filtr se nanese 0,2 ml přípravku a během filtrace se přidá 20 ml roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l). Radioaktivita na filtru je nejméně 95 % z celkové radioaktivity zkoušeného přípravku.

Velikost částic. Hodnotí se za použití mikroskopu. Pokud je to nutné, přípravek se zředí tak, aby počet částic byl dostatečně nízký pro jejich rozlišení. Použije se stříkačka s jehlou o průměru nejméně 0,35 mm. Potřebné množství se umístí do vhodného zařízení, jako je hemocytometrická komůrka; komůrka nemá být přeplněna. Suspenze se nechá 1 min stát a pak se opatrně přikryje krycím sklíčkem bez stlačení vzorku. Hodnotí se nejméně 5000 částic. Částice mají stejný kulovitý vzhled. Nejvýše 10 částic má maximální rozměr větší než 75 µm, žádná částice nemá maximální rozměr větší než 100 µm.

Počet částic. Hodnotí se za použití mikroskopu. Použije se vhodné zařízení, jako je hemocytometrická komůrka, a naplní se vhodně zředěným přípravkem tak, aby během převádění nedošlo k oddělení částic. Spočítá se počet částic v komůrce. Postup se opakuje dvakrát a vypočítá se počet částic v mililitru přípravku.

Cín.

Zkoušený roztok. K 1,0 ml přípravku se přidá 0,5 ml *kyseliny sírové R* a 1,5 ml *kyseliny dusičné R,* zahřívá se a odpaří se asi na 1 ml. Přidají se 2 ml *vody R* a znovu se odpaří asi na 1 ml. Tento postup se opakuje dvakrát, roztok se ochladí a zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 25,0 ml. *Porovnávací roztok.* 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidají 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R* a 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (3 mg Sn v mililitru).

Fyziologická distribuce. Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml do vena caudalis. Po 15 min se potkani usmrtí, vyjmou se játra, slezina a plíce a vhodným přístrojem se změří radioaktivita orgánů, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Odstraní se ocas a změří se radioaktivita zbytku těla, včetně krve a zadržené moči. Procenta radioaktivity v játrech, ve slezině a v plicích se stanoví ze vztahu:

$$\frac{A}{B} \cdot 100 ,$$

v němž značí:

A - radioaktivitu jednotlivého orgánu,

B - celkovou radioaktivitu jater, sleziny, plic a zbytku těla, včetně zadržené moči.

Nejméně u dvou ze tří potkanů se alespoň 80 % radioaktivity nachází v plicích a nejvýše 5 % v játrech a slezině. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Pyrogenní látky. Vyhovuje zkoušce na pyrogenní látky uvedené v článku *Radiofarmaca*. Na 1 kg hmotnosti králíka se vstříkne nitrožilně 0,1 ml zkoušeného přípravku. Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

V označení na obalu se uvede:

- množství cínu v mililitru, pokud ho přípravek obsahuje,
- že přípravek se má před použitím protřepat.

Technetii[^{99m}Tc] pentetatis solutio iniectabilis

Injekce s pentetanem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok, který může být připraven smícháním roztoku diethylentriaminopentaacetatu sodného nebo diethylentriaminopentaacetatu sodno-vápenatého a cínaté soli s roztokem technecistanu[^{99m}Tc] sodného. Obsahuje proměnné množství cínu (Sn) nepřevyšující 1 mg v mililitru. Může obsahovat vhodné protimikrobní přísady, antioxidanty, stabilizátory a tlumivé roztoky. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95,0 % radioaktivity odpovídá komplexu pentetanu sodného nebo pentetanu sodno-vápenatého s techneciem-99m.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý nebo nažloutlý roztok.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogramy získané ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti přípravku.

C. Do čisté suché 10ml skleněné zkumavky se umístí takový objem zkoušeného přípravku, aby obsahoval 2 mg pentetanu. Pokud je to nutné, zředí se *vodou R* na 1 ml. Do druhé zkumavky se umístí 1 ml *vody R* (kontrolní roztok). Do každé zkumavky se přidá 0,1 ml roztoku *síranu nikelnatého R* (1 g/l), 0,5 ml roztoku *kyseliny octové ledové R* 50% *(V/V)* a 0,75 ml roztoku *hydroxidu sodného R* (50 g/l). Po promíchání se změří hodnota pH, která je nejvýše 5. Do každé zkumavky se přidá 0,1 ml roztoku *dimethylglyoximu R* (10 g/l) v *lihu 96% R*. Promíchá se a nechá se 2 min stát. V každé zkumavce se upraví hodnota pH na nejméně 12 přidáním roztoku *hydroxidu sodného R* (100 g/l). Promíchá se a zkontroluje, zda hodnota pH není menší než 12, a nechá se 2 min stát. Zkumavky se opatrně zahřívají 2 min na vodní lázni. Roztok ve zkumavce obsahující zkoušený přípravek zůstane čirý a bezbarvý. Kontrolní roztok se po přidání roztoku dimethylglyoximu zbarví červeně a po zahřátí na vodní lázni vznikne červená sraženina.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 4,0 až 7,5.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Deska se 10 min zahřívá při 110 °C. Použije se taková vrstva, aby při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhlo během 10 min 10 cm až 15 cm.

a) Na vrstvu se nanese 5 µl až 10 µl přípravku a ihned se vyvíjí roztokem *chloridu sodného R* (9 g/l) po dráze 10 cm až 15 cm, nechá se usušit na vzduchu a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Nečistoty v koloidní formě zůstávají na startu, komplex pentetanu s techneciem a technecistanový iont jsou v blízkosti čela rozpouštědla.

b) Na vrstvu se nanese 5 µl až 10 µl přípravku, nechá se usušit a vyvíjí se *2-butanonem R* po dráze 10 cm až 15 cm, nechá se usušit a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Technecistanový iont je v blízkosti čela rozpouštědla, komplex pentetanu s techneciem a nečistoty v koloidní formě zůstávají na startu.

Součet procent radioaktivity odpovídající nečistotám na chromatogramech získaných ve zkouškách (a) a (b) není větší než 5,0 %.

Cín.

Zkoušený roztok. 1,5 ml zkoušeného přípravku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 25,0 ml.

Porovnávací roztok. 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Měří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (1 mg Sn v mililitru).

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Technetii[^{99m}Tc] succimeri solutio iniectabilis

Injekce se sukcimerem značeným techneciem[^{99m}Tc]

Je to sterilní roztok *meso*-2,3-dimerkaptojantarové kyseliny značené techneciem-99m. Obsahuje redukující látku, jako je sůl cínu v množství nepřevyšujícím 1 mg Sn v mililitru. Může obsahovat stabilizátory a antioxidanty, jako je kyselina askorbová, a také může obsahovat inertní přísady. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity technecia-99m k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Nejméně 95,0 % radioaktivity odpovídá komplexu sukcimeru s techneciem-99m.

Připravuje se z injekce s technecistanem[^{99m}Tc] sodným (štěpný nebo neštěpný produkt) za použití vhodných sterilních složek prostých pyrogenních látek. Provede se výpočet poměru radionuklidových nečistot vztažený k datu a hodině podání.

Injekční stříkačka používaná k manipulaci s eluátem určeným ke značení konečného produktu nebo pro manipulaci s konečným produktem by neměla obsahovat gumové části.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Technecium-99m má poločas přeměny 6,02 h a emituje záření gama.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca*. Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku technecia-99m. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku technecia-99m. Referenční roztoky technecia-99m a molybdenu-99 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama technecia-99m mají energii 0,140 MeV.

B. Hodnotí se chromatogram získaný ve zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti.

C. 1 ml přípravku se vloží do zkumavky, přidá se 1 ml roztoku *nitroprussidu sodného R* (20 g/l), 0,1 ml *kyseliny octové ledové R* a promíchá se. Na hladinu roztoku se opatrně přidá vrstva *amoniaku 26% R*; rozhraní vrstev se zbarví fialově.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3)*. 2,3 až 3,5.

Radiochemická čistota. Provede se tenkovrstvá chromatografie *(2.2.27)*, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*, za použití silikagelu na vrstvě skleněných vláken. Deska se 10 min zahřívá při 110 °C. Použije se taková vrstva, aby při vyvíjení čelo mobilní fáze dosáhlo během 10 min 10 cm až 15 cm.

Na vrstvu se nanese 5 µl až 10 µl přípravku a ihned se vyvíjí *2-butanonem R* po dráze 10 cm až 15 cm, usuší se na vzduchu a vhodným detektorem se stanoví rozdělení radioaktivity. Komplex sukcimeru s techneciem zůstává na startu, technecistanový iont se pohybuje v blízkosti čela rozpouštědla. Nejméně 95,0 % z celkové radioaktivity se nachází ve skvrně odpovídající komplexu sukcimeru s techneciem. Nejvýše 2,0 % z celkové radioaktivity připadají na technecistanový iont.

Cín.

Zkoušený roztok. 1,5 ml přípravku se zředí *kyselinou chlorovodíkovou 1 mol/l RS* na 25,0 ml.
Porovnávací roztok. 0,115 g *chloridu cínatého R* se rozpustí v *kyselině chlorovodíkové 1 mol/l RS* a zředí se jí na 1000,0 ml.

K 1,0 ml každého roztoku se přidá 0,4 ml roztoku *laurylsíranu sodného R* (20 g/l), 0,05 ml *kyseliny thioglykolové R*, 0,1 ml *zkoumadla dithiolového R*, 3,0 ml *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* a promíchá se. Nechá se stát 60 min a změří se absorbance *(2.2.25)* každého roztoku při 540 nm za použití *kyseliny chlorovodíkové 0,2 mol/l RS* jako kontrolní kapaliny. Absorbance zkoušeného roztoku není větší než absorbance porovnávacího roztoku (1 mg Sn v mililitru).

Fyziologická distribuce. Každému ze tří potkanů vážících 150 g až 250 g se vstříkne nejvýše 0,2 ml, neobsahující více než 0,1 mg kyseliny dimerkaptojantarové, do vhodné žíly, jako je vena caudalis nebo vena saphena. Změří se aktivita ve stříkačce před podáním a po podání. Po 1 h se potkani usmrtí, vyjmou se ledviny, játra, žaludek, plíce, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocas. Vhodným přístrojem se stanoví radioaktivita orgánů, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, i ocasu, jak je popsáno v článku *Radiofarmaca*. Stanoví se procenta radioaktivity v každém orgánu vztažená k celkové radioaktivitě (vypočítané jako rozdíl mezi aktivitou naměřenou ve stříkačce před podáním a po podání, a pokud byla injekce podána do vena caudalis, odečte se i aktivita ocasu).

Nejméně u dvou ze tří potkanů je radioaktivita v ledvinách nejméně 40 %, v játrech nejvýše 10,0 %, v žaludku nejvýše 2,0 % a v plicích nejvýše 5,0 %.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem technecia-99m nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca,* chráněn před světlem.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Thallosi[^{201}Tl] chloridi solutio iniectabilis

Injekce s chloridem thallným[^{201}Tl]

Je to sterilní roztok thallia-201 ve formě chloridu thallného. Může být izotonizován přídavkem chloridu sodného a může obsahovat vhodnou protimikrobní přísadu, jako je benzylalkohol. Thallium-201 je radioaktivní izotop thallia, který vzniká přeměnou olova-201. Olovo-201 je radioaktivní izotop olova, který může být získán ozařováním thallia, jež může být obohaceno thalliem-203, protony o vhodné energii. Thallium-201 se může od olova-201 oddělit pomocí kolony s iontoměničem. Přípravek obsahuje 90,0 % až 110,0 % deklarované radioaktivity thallia-201 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení. Na thallium-202 připadají nejvýše 2,0 % z celkové radioaktivity a na thallium-201 nejméně 97,0 %. Nejméně 95,0 % radioaktivity odpovídá thalliu ve formě thallných iontů. Měrná aktivita není menší než 3,7 GBq v miligramu thallia.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.
Thallium-201 má poločas přeměny 3,05 dne a emituje záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

A. Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku thallia-201. Provede se přímé porovnání spekter nebo se použije zařízení kalibrované pomocí referenčního roztoku thallia-201. Referenční roztoky thallia-201 a thallia-202 se získávají od národní laboratoře. Nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,135 MeV, 0,166 MeV a 0,167 MeV. Rtg-záření má energie 0,069 MeV až 0,083 MeV.

B. Hodnotí se elektroforeogram získaný při zkoušce Radiochemická čistota. Rozdělení radioaktivity je zároveň zkouškou totožnosti.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 4,0 až 7,0.

Radionuklidová čistota. Vhodným přístrojem kalibrovaným pomocí referenčních roztoků thallia-201 a thallia-202 se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku thallia-201. Stanoví se relativní obsah thallia-201, thallia-202 a ostatních radionuklidových nečistot. Thallium-202 má poločas přeměny 12,2 dne a nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,440 MeV. Thallium-200 má poločas přeměny 1,09 dne a nejvíce zastoupené fotony gama mají energie 0,368 MeV, 0,579 MeV, 0,828 MeV a 1,206 MeV. Olovo-201 má poločas přeměny 9,4 h a nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,331 MeV. Olovo-203 má poločas přeměny 2,17 dne a nejvíce zastoupené fotony gama mají energii 0,279 MeV. Nejvýše 2,0 % z celkové radioaktivity odpovídá thalliu-202 a nejméně 97,0 % odpovídá thalliu-201.

Radiochemická čistota. Provede se zónová elektroforéza *(2.2.31)* za použití pruhu vhodného acetatu celulosy dlouhého 150 mm a širokého 25 mm jako nosiče a roztoku *edetanu disodného R* (18,6 g/l) jako elektrolytu. Pruh se 45 min až 60 min namáčí v roztoku elektrolytu, pak se pinzetou vyjme pouze za vnější konce,umístí se mezidvě absorpční podložky a odstraní se přebytečný roztok.

Zkoušený roztok. Připraví se smícháním stejných objemových dílů zkoušeného přípravku a elektrolytu.

Nanese se nejméně 5 μl zkoušeného roztoku do středu pruhu a označí se místo aplikace. Nechá se 30 min působit elektrické pole 17 V na centimetr, pruh se usuší na vzduchu a rozdělení radioaktivity se stanoví za použití vhodného zařízení. Nejméně 95,0 % radioaktivity se pohybuje směrem ke katodě.

Thallium. K 0,5 ml přípravku se přidá 0,5 ml *kyseliny chlorovodíkové R* (220 g/l HCl), 0,05 ml *vody bromové R* a promíchá se. Přidá se 0,1 ml roztoku *kyseliny sulfosalicylové R* (30 g/l); po odbarvení se přidá 1,0 ml roztoku *rhodaminu B R* (1 g/l), 4 ml *toluenu R* a 1 min se protřepává. Oddělí se toluenová vrstva, která není zbarvena intenzivněji než toluenová vrstva kontrolního roztoku připraveného současně stejným způsobem za použití 0,5 ml základního *roztoku thallia (10 μl Tl/ml)*.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Změří se radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem thallia-201 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca*.

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Xenoni[^{133}Xe] solutio iniectabilis

Injekce s xenonem[^{133}Xe]

Je to sterilní roztok xenonu-133, který může být izotonizován přídavkem chloridu sodného. Xenon-133 je radioaktivní izotop xenonu, který se získává separací ze štěpných produktů uranu. Přípravek obsahuje 80 % až 130 % deklarované radioaktivity xenonu-133 k referenčnímu datu a hodině uvedeným v označení.

Přípravek je umístěn v obalu, který umožňuje manipulaci s obsahem bez vzniku vzduchových bublin. Obal je maximálně naplněn a bubliny plynu nezaujímají více než 1 % objemu přípravku; určí se vizuálním porovnáním s vhodným porovnávacím roztokem.

Vlastnosti

Čirý bezbarvý roztok.

Xenon-133 má poločas přeměny 5,29 dne a emituje záření beta, záření gama a rtg-záření.

Zkoušky totožnosti

Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku xenonu-133 v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), kromě rozdílů způsobených přítomností xenonu-131m a xenonu-133m. Referenční roztoky xenonu-133 se získávají od národní laboratoře (připravují se za použití vhodné ionizační komory). Nejvíce zastoupené fotony gama xenonu-133 mají energii 0,081 MeV a jsou doprovázeny rtg-zářením (vznikajícím v důsledku vnitřní konverze), které má energie 0,030 MeV až 0,035 MeV. Xenon-131m má poločas přeměny 11,9 dne a emituje fotony gama o energii 0,164 MeV. Xenon-133m má poločas přeměny 2,19 dne a emituje fotony gama o energii 0,233 MeV.

Zkoušky na čistotu

Hodnota pH *(2.2.3).* 5,0 až 8,0.

Radionuklidová čistota.

a) Vhodným přístrojem se zaznamená spektrum záření gama a rtg-záření způsobem uvedeným v článku *Radiofarmaca.* Spektrum se významně neliší od spektra referenčního roztoku xenonu-133 v roztoku *chloridu sodného R* (9 g/l), kromě rozdílů způsobených přítomností xenonu-131m a xenonu-133m.

b) 2 ml přípravku se převedou do otevřené baňky a 30 min se probublávají vzduchem při dodržení vhodných opatření proti rozptýlení radioaktivity. Změří se zbytková beta a gama radioaktivita roztoku, která se významně neliší od aktivity pozadí zaznamenané přístrojem.

Sterilita. Vyhovuje zkoušce na sterilitu uvedené v článku *Radiofarmaca.* Přípravek se může použít před dokončením zkoušky.

Stanovení radioaktivity

Zváží se obal s obsahem, stanoví se celková radioaktivita postupem popsaným v článku *Radiofarmaca* a porovná se za použití vhodného zařízení s referenčním roztokem xenonu-133 nebo se změří na přístroji kalibrovaném pomocí tohoto roztoku při dodržení přesně stejných podmínek měření. Při použití ionizační komory by se mělo dbát na to, aby stěny komory příliš nezeslaboval y záření. Pak se oddělí nejméně polovina obsahu a obal se opět zváží. Změří se radioaktivita obalu a zbylého obsahu, jak je popsáno výše, a z měření se vypočte radioaktivita xenonu-133 v přípravku.

Uchovávání

Viz článek *Radiofarmaca.*

Označování

Viz článek *Radiofarmaca.*

Upozornění: Největší množství xenonu-133 může být přítomno na uzávěru nebo na stěnách obalu, proto se s ním musí počítat při dodržování pravidel týkajících se převozu a uchovávání radioaktivních látek a při manipulaci s použitými obaly.

3358

Obsah

Vysvětlení zkratek:
- bez označení jsou články a stati přeložené z Ph. Eur. 3,
- s označením 1998 jsou články a stati přeložené z Doplňku Ph. Eur. 3 1998,
- s označením corr jsou články a stati, u nichž byla realizována oprava uveřejněná v Doplňku Ph. Eur. 3 1998,
- s označením N jsou národní články a stati.

1 Všeobecná část **3**

1.1 Úvodní ustanovení **3**

1.2 Obecné zásady **4**

1.3 Značky a symboly **12**

1.4 Jednotky mezinárodní soustavy (SI) použité v lékopise a vztah k jiným jednotkám **15**

N Tabulka relativních atomových hmotností **19**

2 Zkušební metody **23**

2.1 Přístroje a jiné pomůcky ke zkoušení **25**

2.1.1 Kapátka 25
2.1.2 Porovnávací tabulka stupňů pórovitosti pro filtry ze slinutého skla 26
2.1.3 Ultrafialové lampy pro analytické účely 26
2.1.4 Síta 27
2.1.5 Zkumavky pro porovnávací zkoušky 28
2.1.6 Detekční trubičky pro plyny 29

2.2 Fyzikální a fyzikálně-chemické metody **31**

2.2.1 Čirost a stupeň opalescence tekutin 31
2.2.2 Stupeň zbarvení tekutin 31
2.2.3 Potenciometrické stanovení pH 35
2.2.4 Vztah mezi reakcí roztoku, přibližnými hodnotami pH a zabarvením některých indikátorů 38
2.2.5 Relativní hustota 39
2.2.6 Index lomu 39
2.2.7 Optická otáčivost 40
2.2.8 Viskozita 41
2.2.9 Měření kapilárním viskozimetrem 41
2.2.10 Měření rotačním viskozimetrem 42
2.2.11 Destilační rozmezí 43
2.2.12 Teplota varu 44
2.2.13 Stanovení vody destilací 45
2.2.14 Teplota tání - kapilární metoda 46
2.2.15 Teplota tání - metoda otevřené kapiláry 46

2.2.16 Teplota tání - stanovení v kovovém bloku . . . 47
2.2.17 Teplota skápnutí . . . 47
2.2.18 Teplota tuhnutí . . . 49
2.2.19 Ampérometrické titrace . . . 49
2.2.20 Potenciometrické titrace . . . 50
2.2.21 Fluorimetrie . . . 50
2.2.22 Atomová emisní spektrometrie . . . 51
2.2.23 Atomová absorpční spektrometrie . . . 52
2.2.24 Absorpční spektrofotometrie v infračervené oblasti . . . 53
2.2.25 Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti . . . 55
2.2.26 Papírová chromatografie . . . 58
2.2.27 Tenkovrstvá chromatografie . . . 59
2.2.28 Plynová chromatografie . . . 60
2.2.29 Kapalinová chromatografie . . . 63
2.2.30 Vylučovací chromatografie . . . 65
2.2.31 Elektroforéza . . . 66
2.2.32 Ztráta sušením . . . 69
2.2.33 Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie . . . 69
2.2.34 Termogravimetrie . . . 71
2.2.35 Osmolalita . . . 71
2.2.36 Potenciometrické stanovení koncentrace iontů pomocí iontově selektivních elektrod . . . 72
2.2.37 Rentgenová fluorescenční spektrometrie . . . 75
2.2.38 Měrná elektrická vodivost . . . 76
2.2.39 Stanovení distribuce molekulových hmotností v dextranu . . . 78
2.2.40 Spektrometrie v blízké infračervené oblasti . . . 81

2.3 Zkoušky totožnosti . . . 84

2.3.1 Zkoušky totožnosti iontů a skupin . . . 84
2.3.2 Totožnost mastných olejů tenkovrstvou chromatografií . . . 90
2.3.3 Totožnost fenothiazinových derivátů tenkovrstvou chromatografií . . . 91
2.3.4 Pach . . . 92

2.4 Limitní zkoušky . . . 93

2.4.1 Amonium . . . 93
2.4.2 Arsen . . . 93
2.4.3 Vápník . . . 94
2.4.4 Chloridy . . . 94
2.4.5 Fluoridy . . . 95
2.4.6 Hořčík . . . 96
2.4.7 Hořčík a kovy alkalických zemin . . . 96
2.4.8 Těžké kovy . . . 96
2.4.9 Železo . . . 99
2.4.10 Olovo v cukrech . . . 99
2.4.11 Fosforečnany . . . 100
2.4.12 Draslík . . . 100
2.4.13 Sírany . . . 100

2.4.14 Síranový popel 100
2.4.15 Nikl v polyolech 101
2.4.16 Celkový popel 101
2.4.17 Hliník 101
2.4.18 Volný formaldehyd 101
2.4.19 Zásaditě reagující látky v mastných olejích 102
2.4.20 Antioxidanty v mastných olejích 102
2.4.21 Cizí oleje v mastných olejích tenkovrstvou chromatografií 105
2.4.22 Cizí oleje v mastných olejích plynovou chromatografií 106
2.4.23 Steroly v mastných olejích 108
2.4.24 Zbytková rozpouštědla 111
2.4.25 Zbytkový ethylenoxid a dioxan 113

2.5 Stanovení obsahu 116

2.5.1 Číslo kyselosti 116
2.5.2 Číslo esterové 116
2.5.3 Číslo hydroxylové 116
2.5.4 Číslo jodové 117
2.5.5 Číslo peroxidové 118
2.5.6 Číslo zmýdelnění 119
1998 2.5.7 Nezmýdelnitelné látky 119
2.5.8 Dusík v primárních aromatických aminech 120
2.5.9 Dusík mineralizací s kyselinou sírovou 120
2.5.10 Spalování organických látek v kyslíku 120
2.5.11 Chelatometrické titrace 121
2.5.12 Semimikrostanovení vody 122
2.5.13 Hliník ve vakcínách 123
2.5.14 Vápník ve vakcínách 123
2.5.15 Fenol v imunních sérech a vakcínách 123
2.5.16 Bílkoviny v polysacharidových vakcínách 123
2.5.17 Nukleové kyseliny v polysacharidových vakcínách 124
2.5.18 Fosfor v polysacharidových vakcínách 124
2.5.19 O-acetyl v polysacharidových vakcínách 125
2.5.20 Hexosaminy v polysacharidových vakcínách 126
2.5.21 Methylpentosy v polysacharidových vakcínách 126
2.5.22 Kyseliny uronové v polysacharidových vakcínách 127
2.5.23 Kyselina sialová v polysacharidových vakcínách 127
2.5.24 Oxid uhličitý v medicinálních plynech 128
2.5.25 Oxid uhelnatý v medicinálních plynech 129
2.5.26 Oxid dusnatý a oxid dusičitý v medicinálních plynech 130
2.5.27 Kyslík v medicinálních plynech 131
2.5.28 Voda v medicinálních plynech 132
2.5.29 Oxid siřičitý 132
2.5.30 Oxidanty 132

2.6 Biologické zkoušky **134**
2.6.1 Zkouška na sterilitu 134
2.6.2 Mycobacterium tuberculosis 141
2.6.3 Důkaz cizích virů zkouškou na kuřecích embryích 142
2.6.4 Zkouška na viry leukózy 142
2.6.5 Důkaz cizích virů zkouškou na buněčných kulturách 143
2.6.6 Důkaz cizích antigenů zkouškou na kuřatech 143
2.6.7 Zkouška na mykoplazmata 144
2.6.8 Zkouška na pyrogenní látky 147
2.6.9 Zkouška na neškodnost 149
2.6.10 Zkouška na přítomnost histaminu 150
2.6.11 Zkouška na hypotenzivní látky 151
2.6.12 Zkouška mikrobiálního znečištění nesterilních výrobků (celkový počet živých aerobů) 152
2.6.13 Zkoušky na specifické mikroorganismy 159
2.6.14 Bakteriální endotoxiny 162
2.6.15 Aktivátor prekalikreinu 172
2.6.16 Důkaz cizích antigenů v humánních virových vakcínách 173
2.6.17 Zkouška antikomplementární účinnosti imunoglobulinu 175
2.6.18 Zkouška neurovirulence živých virových vakcín 179
2.6.19 Zkouška neurovirulence vakcíny proti obrně (per os) 180
2.6.20 Hemaglutininy anti-A a anti-B (nepřímá metoda) 182

2.7 Metody stanovení účinnosti **183**
2.7.1 Imunochemické metody 183
2.7.2 Mikrobiologické stanovení účinnosti antibiotik 185
2.7.3 Stanovení účinnosti kortikotropinu 196
2.7.4 Stanovení účinnosti krevního koagulačního faktoru VIII 197
2.7.5 Stanovení účinnosti heparinu 199
2.7.6 Stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti záškrtu 200
2.7.7 Stanovení účinnosti vakcíny proti dávivému kašli 202
2.7.8 Stanovení účinnosti adsorbované vakcíny proti tetanu 203
2.7.9 Zkouška na Fc funkci imunoglobulinu 205

2.8 Farmakognostické metody **208**
N Vzorkování drog 208
N Stupeň rozdrobnění 208
2.8.1 Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové 209
2.8.2 Cizí příměsi 210
2.8.3 Stomata (průduchy) a stomatální index 210
2.8.4 Číslo bobtnavosti 211
2.8.5 Voda v silicích 211
2.8.6 Cizí estery v silicích 211
2.8.7 Mastné oleje a zpryskyřičnatělé silice v silicích 211
2.8.8 Pach a chuť silic 212
2.8.9 Zbytek po odpaření silic 212
2.8.10 Rozpustnost silic v lihu 96% 212

2.8.11 Stanovení cineolu v silicích 213
2.8.12 Stanovení silic v rostlinných drogách 214
2.8.13 Zbytky pesticidů 216

2.9 Metody farmaceutické technologie 223

2.9.1 Zkouška rozpadavosti tablet a tobolek 223
2.9.2 Zkouška rozpadavosti rektálních a vaginálních přípravků 224
N Stanovení doby úplné deformace hydrofobních čípků 226
2.9.3 Zkouška disoluce pevných lékových forem 226
2.9.4 Zkouška disoluce transdermálních přípravků 232
2.9.5 Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem 236
2.9.6 Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem 237
2.9.7 Oděr neobalených tablet 238
2.9.8 Pevnost tablet 239
2.9.9 Měření konzistence penetrometricky 240
2.9.10 Stanovení obsahu ethanolu v tekutých přípravcích a lihová tabulka 242
N Stanovení ethanolu v tekutých přípravcích plynovou chromatografií 245
2.9.11 Stanovení methanolu a 2-propanolu v tekutých přípravcích 246
N Stanovení methanolu a 2-propanolu v tekutých přípravcích plynovou chromatografií 246
2.9.12 Klasifikace velikosti částic prášků sítováním 247
2.9.13 Mikroskopické stanovení limitní velikosti částic 247
2.9.14 Stanovení měrné plochy povrchu pomocí průniku vzduchu 248
2.9.15 Zdánlivý objem 251
2.9.16 Sypnost 252
2.9.17 Zkouška na využitelný objem 254
2.9.18 Přípravky k inhalaci: aerodynamické stanovení jemných částic 256
2.9.19 Hodnocení kontaminace částicemi pod hranicí viditelnosti 269
2.9.20 Hodnocení kontaminace viditelnými částicemi 269
2.9.21 Mikroskopické hodnocení kontaminace částicemi 270

3 Obaly a obalový materiál 273

3.1 Materiály používané pro výrobu obalů 275

3.1.1 Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro obaly na lidskou krev a krevní složky a pro obaly na vodné roztoky k intravenózní infuzi 275
3.1.2 Materiály na bázi měkčeného polyvinylchloridu pro hadičky používané v soupravách pro transfuzi krve a krevních složek 279
3.1.3 Polyolefiny 282
3.1.4 Polyethylen bez přísad pro obaly parenterálních a očních přípravků 287
3.1.5 Polyethylen s přísadami pro obaly parenterálních a očních přípravků 289
3.1.6 Polypropylen pro obaly a uzávěry parenterálních a očních přípravků 294
3.1.7 Kopolymer ethylen-vinylacetat pro obaly a hadičky přípravků parenterální výživy 300
3.1.8 Silikonový olej používaný jako mazivo 303
3.1.9 Silikonový elastomer pro uzávěry a hadičky 304

3.2 Obaly **308**
3.2.1 Skleněné obaly pro farmaceutické použití 308
3.2.2 Obaly a uzávěry z plastů 314
3.2.3 Sterilní obaly z plastů na lidskou krev a krevní složky 315
3.2.4 Prázdné sterilní obaly z měkčeného polyvinylchloridu na lidskou krev a krevní složky 319
3.2.5 Sterilní obaly z měkčeného polyvinylchloridu na lidskou krev obsahující antikoagulační roztok 320
3.2.6 Soupravy pro transfuzi krve a krevních složek 321
3.2.7 Obaly z plastů na vodné roztoky k intravenózní infuzi 323
3.2.8 Sterilní injekční stříkačky z plastů na jedno použití 324
3.2.9 Pryžové uzávěry obalů na vodné přípravky k parenterálnímu použití 327

4 Zkoumadla **331**

4.1 Zkoumadla, roztoky pro limitní stanovení nečistot, tlumivé roztoky **334**
4.1.1 Zkoumadla 334
4.1.2 Základní roztoky pro limitní stanovení nečistot 531
4.1.3 Tlumivé roztoky 539

4.2 Odměrná analýza **548**
4.2.1 Základní látky pro odměrné roztoky 548
4.2.2 Odměrné roztoky 549
N Seznam referenčních látek použitých v národních článcích 559

5 Všeobecné dodatky **561**

5.1 Dodatky k technologii léčivých přípravků **563**
5.1.1 Metody přípravy sterilních výrobků 563
5.1.2 Biologické indikátory pro sterilizaci 566
5.1.3 Účinnost protimikrobních konzervačních látek 568
5.1.4 Mikrobiologická jakost léčivých přípravků 570
5.1.5 Používání pojmu F_0 při sterilizaci vodných přípravků parou 571

5.2 Dodatky k technologii vakcín **573**
5.2.1 Terminologie použitá v článcích vakcín 573
5.2.2 Chovy kuřat prostých specifikovaných patogenů, která jsou určena pro výrobu a kontrolu jakosti vakcín 574
5.2.3 Humánní diploidní buňky pro výrobu humánních vakcín 577
5.2.4 Buněčné kultury pro výrobu veterinárních vakcín 579
5.2.5 Látky živočišného původu pro výrobu veterinárních vakcín 583
5.2.6 Hodnocení bezpečnosti veterinárních vakcín 584
5.2.7 Hodnocení účinnosti veterinárních vakcín 587

5.3 Statistické analýzy výsledků biologických zkoušek **588**

N Tabulka č. I: Omamné a psychotropní látky **651**

N Tabulka č. II: Venena **652**

N Tabulka č. III: Separanda **653**

N Tabulka č. IV: Doporučené terapeutické dávky léčiv pro dospělé **659**

N Tabulka č. V: Doporučené terapeutické dávky léčiv pro děti **712**

N Tabulka č.VI: Doporučené dávky některých oficinálních léčiv používaných u zvířat 737

6 Speciální část **769**

6.1 Léčivé a pomocné látky **771**

N Absinthii herba 771
Acaciae gummi 772
Acaciae gummi dispersione desiccatum 774
Acebutololi hydrochloridum 775
corr Acetazolamidum 778
Acetonum 780
Acetylcysteinum 781
1998 Aciclovirum 784
Acidum aceticum 99% 788
Acidum acetylsalicylicum 789
Acidum alginicum 791
Acidum amidotrizoicum dihydricum 792
Acidum aminocaproicum 794
Acidum ascorbicum 796
Acidum asparticum 798
Acidum benzoicum 800
Acidum boricum 801
Acidum citricum 802
Acidum citricum monohydricum 804
Acidum etacrynicum 806
Acidum folicum 807
Acidum fusidicum 809
Acidum glutamicum 811
Acidum hydrochloricum 35% 813
Acidum hydrochloricum 10% 814
Acidum iopanoicum 815
Acidum iotalamicum 817
Acidum lacticum 819
Acidum maleicum 820
Acidum methacrylicum et ethylis acrylas polymerisatum 1 : 1 822
Acidum methacrylicum et ethylis acrylas polymerisatum 1 : 1 dispersio 30% 824
Acidum methacrylicum et methylis methacrylas polymerisatum 1 : 1 825
Acidum methacrylicum et methylis methacrylas polymerisatum 1:2 827
Acidum nalidixicum 828
Acidum nicotinicum 830
Acidum oleicum 831
N Acidum peraceticum 35% 832

Acidum phosphoricum 85% 834
Acidum phosphoricum 10% 835
1998 Acidum salicylicum 836
Acidum sorbicum 838
Acidum tartaricum 840
Acidum tiaprofenicum 841
Acidum tranexamicum 844
Acidum undecylenicum 846
N Aconiti radix 847
Adeninum 849
Adeps lanae 851
Adeps lanae cum aqua 853
Adeps lanae hydrogenatus 855
Adeps solidus 857
N Adeps suillus 858
1998 Aer medicalis 859
Agar 863
N Agrimoniae herba 864
Alaninum 866
Alcohol benzylicus 868
Alcohol cetylicus 870
Alcohol cetylstearylicus 871
Alcohol cetylstearylicus emulsificans A 873
Alcohol cetylstearylicus emulsificans B 876
Alcohol isopropylicus 878
Alcohol stearylicus 880
Alcoholes adipis lanae 882
corr Alfentanili hydrochloridum 884
Algeldratum 888
Allopurinolum 889
Aloe barbadensis 890
Aloe capensis 892
N Aloxiprinum 894
Alprazolamum 895
Alprenololi benzoas 900
Alprenololi hydrochloridum 903
N Althaeae folium 906
Althaeae radix 907
Aluminii chloridum hexahydricum 908
Aluminii sulfas 909
Amantadini hydrochloridum 910
Amfetamini sulfas 912
Amiloridi hydrochloridum 913
N Aminophenazonum 915
Aminophyllinum 917
Aminophyllinum hydricum 919
Amiodaroni hydrochloridum 920

Amitriptylini hydrochloridum 923
Ammoniae solutio concentrata 925
Ammonii chloridum 926
Amobarbitalum 927
Amobarbitalum natricum 929
1998 Amoxicillinum natricum 931
1998 Amoxicillinum trihydricum 938
Ampicillinum 944
1998 Ampicillinum natricum 950
Ampicillinum trihydricum 958
Amygdalae oleum 964
Amygdalae oleum raffinatum 966
corr Anisi etheroleum 967
Anisi fructus 970
Anisi stellati fructus 971
Antazolini hydrochloridum 973
Apomorphini hydrochloridum 975
Aprotinini solutio concentrata 976
Aprotininum 979
Aqua pro iniectione 982
Aqua purificata 985
Arachidis oleum 987
Argenti nitras 988
Arginini hydrochloridum 989
Argininum 991
Ascorbylis palmitas 993
Aspartamum 995
Astemizolum 997
Atenololum 1002
Atropini sulfas 1004
N Aurantii dulce pericarpium 1006
Azathioprinum 1007
Bacampicillini hydrochloridum 1009
Bacitracinum 1012
Bacitracinum zincicum 1014
Baclofenum 1015
Balsamum peruvianum 1018
N Balsamum tolutanum 1019
Barbitalum 1021
Barii sulfas 1023
Beclometasoni dipropionas 1024
Belladonnae folium 1027
Bendroflumethiazidum 1030
Bentonitum 1031
Benzalkonii chloridi solutio 1032
Benzalkonii chloridum 1034
Benzathini benzylpenicillinum 1036

Benzethonii chloridum 1039
Benzocainum 1040
Benzoylis peroxidum cum aqua 1041
Benzylis benzoas 1044
1998 Benzylpenicillinum kalicum 1045
1998 Benzylpenicillinum natricum 1050
N Bergamottae etheroleum 1054
Betacarotenum 1058
corr Betadexum 1059
Betahistini dimesilas 1062
1998 Betamethasoni acetas 1064
Betamethasoni dipropionas 1068
1998 Betamethasoni natrii phosphas 1071
Betamethasoni valeras 1074
Betamethasonum 1077
Betanidini sulfas 1082
Betaxololi hydrochloridum 1084
1998 Betulae folium 1086
Biotinum 1088
Biperideni hydrochloridum 1090
Bisacodylum 1092
Bismuthi subcarbonas 1094
Bleomycini sulfas 1096
N Boldo folium 1098
Bromazepamum 1100
Bromhexini hydrochloridum 1103
Bromocriptini mesilas 1105
1998 Brompheniramini hydrogenomaleas 1107
Budesonidum 1110
Bumetanidum 1114
Bupivacaini hydrochloridum 1116
corr Buserelinum 1118
Busulfanum 1121
N Butamirati dihydrogenocitras 1122
Butylhydroxyanisolum 1124
Butylhydroxytoluenum 1126
Butylparabenum 1127
Butylscopolamini bromidum 1129
N Cacao oleum 1131
Calcii carbonas 1132
Calcii chloridum dihydricum 1133
Calcii chloridum hexahydricum 1135
1998 Calcii dobesilas 1136
Calcii folinas 1138
Calcii gluconas 1142
corr Calcii gluconas pro iniectione 1143
Calcii glycerophosphas 1146

Calcii hydrogenophosphas 1148
Calcii hydrogenophosphas dihydricus 1149
Calcii hydroxidum 1150
Calcii lactas pentahydricus 1152
Calcii lactas trihydricus 1153
N Calcii oxidum 1155
Calcii pantothenas 1156
1998 Calcii phosphas 1157
Calcii stearas 1159
Calcii sulfas dihydricus 1161
N Calcii sulfas hemihydricus 1162
Calcitoninum salmonis 1163
1998 Calcitriolum 1168
1998 Camphora racemica 1171
Captoprilum 1173
Carbamazepinum 1175
Carbenicillinum natricum 1177
Carbidopum 1181
Carbimazolum 1183
Carbo activatus 1185
Carbocisteinum 1187
1998 Carbonei dioxidum 1189
Carboplatinum 1192
Carboxymethylamylum natricum A 1194
Carboxymethylamylum natricum B 1196
Carmellosum calcicum 1198
Carmellosum natricum 1199
Carmellosum natricum conexum 1201
N Carvi etheroleum 1203
Carvi fructus 1204
Caryophylli etheroleum 1206
Caryophylli flos 1207
1998 Cefaclorum 1209
Cefadroxilum 1213
Cefalexinum monohydricum 1216
1998 Cefalotinum natricum 1219
Cefazolinum natricum 1222
1998 Cefotaximum natricum 1227
Cefoxitinum natricum 1231
Cefradinum 1234
Ceftriaxonum natricum 1237
Cefuroximum natricum 1240
corr Cellacefatum 1243
Cellulosi acetas 1245
Cellulosi pulvis 1246
Cellulosum microcristallinum 1250
N Centaurii herba 1251

Cera alba 1253
Cera carnauba 1255
Cera flava 1256
corr Cetirizini dihydrochloridum 1258
Cetostearomacrogolum 1262
Cetostearylis isononanoas 1265
Cetrimidum 1266
Cetylpyridinii chloridum 1267
Chamomillae romanae flos 1269
Chlorali hydras 1270
Chlorambucilum 1271
Chloramphenicoli natrii succinas 1273
Chloramphenicoli palmitas 1275
Chloramphenicolum 1278
corr Chlorcyclizini hydrochloridum 1280
Chlordiazepoxidi hydrochloridum 1282
Chlordiazepoxidum 1284
Chlorhexidini diacetas 1286
Chlorhexidini digluconatis solutio 1289
Chlorhexidini dihydrochloridum 1292
Chlorobutanolum 1295
Chlorobutanolum hemihydricum 1296
Chlorocresolum 1297
Chloroquini diphosphas 1299
Chloroquini sulfas 1301
Chlorothiazidum 1303
Chlorphenamini hydrogenomaleas 1305
Chlorpromazini hydrochloridum 1307
Chlorpropamidum 1308
Chlorprothixeni hydrochloridum 1311
1998 Chlortalidonum 1313
corr Chlortetracyclini hydrochloridum 1316
Cholesterolum 1319
Chymotrypsinum 1322
Ciclosporinum 1324
Cimetidinum 1326
Cinchocaini hydrochloridum 1328
Cinchonae cortex 1330
Cinnamomi cortex 1333
1998 Cinnarizinum 1334
Ciprofloxacinum 1338
Ciprofloxacinum hydrochloridum 1342
Cisapridum 1346
Cisplatinum 1348
Citri etheroleum 1350
Clindamycini dihydrogenophosphas 1353
Clindamycini hydrochloridum 1357

Clobetasoni butyras 1359
Clofibratum 1361
Clomifeni dihydrogenocitras 1363
Clomipramini hydrochloridum 1366
Clonazepamum 1368
Clonidini hydrochloridum 1370
N Cloroxinum 1372
Clotrimazolum 1374
1998 Cloxacillinum natricum 1376
Cocaini hydrochloridum 1380
Codeini dihydrogenophosphas hemihydricus 1382
Codeini dihydrogenophosphas sesquihydricus 1384
Codeinum 1386
Coffeinum 1388
Coffeinum monohydricum 1390
Colchicinum 1392
Colecalciferoli pulvis 1394
Colecalciferolum 1398
Colecalciferolum densatum oleosum 1401
Colecalciferolum in aqua dispergibile 1404
Colistimethatum natricum 1407
Colistini sulfas 1409
corr Copovidonum 1411
N Coriandri etheroleum 1413
Corticotropinum 1415
Cortisoni acetas 1420
N Crataegi folium cum flore 1423
Crospovidonum 1425
Cupri sulfas 1426
Cupri sulfas pentahydricus 1427
corr Cyanocobalaminum 1429
Cyclizini hydrochloridum 1431
Cyclopentolati hydrochloridum 1433
Cyclophosphamidum 1435
Cyproheptadini hydrochloridum 1437
corr Cyproteroni acetas 1439
Cysteini hydrochloridum 1442
Cystinum 1444
Cytarabinum 1446
N Dacarbazinum 1449
Dapsonum 1453
Daunorubicini hydrochloridum 1455
Deferoxamini mesilas 1458
Demeclocyclini hydrochloridum 1460
Desipramini hydrochloridum 1463
Deslanosidum 1465
1998 Desmopressinum 1467

Desoxycortoni acetas 1471
Dexamethasoni acetas 1473
1998 Dexamethasoni natrii phosphas 1476
1998 Dexamethasonum 1479
Dexpanthenolum 1482
Dextranum 40 pro iniectione 1484
Dextranum 60 pro iniectione 1485
Dextranum 70 pro iniectione 1487
Dextromethorphani hydrobromidum 1489
Dextromoramidi hydrogenotartras 1491
Dextropropoxypheni hydrochloridum 1492
Diazepamum 1494
Diazoxidum 1496
Dibutylis phthalas 1497
Diclofenacum natricum 1499
1998 Dicloxacillinum natricum 1503
Dienestrolum 1507
Diethylcarbamazini dihydrogenocitras 1508
Diethylis phthalas 1510
Diethylstilbestrolum 1512
Diflunisalum 1514
Digitalis purpureae folium 1516
Digitoxinum 1518
Digoxinum 1520
Dihydroergotamini mesilas 1523
Dihydroergotamini tartras 1525
Dihydrostreptomycini sulfas 1527
Dikalii clorazepas 1530
Diltiazemi hydrochloridum 1532
Dimenhydrinatum 1535
Dimercaprolum 1537
Dimethylis sulfoxidum 1538
Dimeticonum 1540
Dinatrii cromoglicas 1541
Dinatrii edetas dihydricus 1543
Diphenhydramini hydrochloridum 1544
Diphenoxylati hydrochloridum 1546
1998 Diprophyllinum 1547
Disopyramidi dihydrogenophosphas 1549
Disopyramidum 1552
Disulfiramum 1554
corr Dithranolum 1556
Domperidoni hydrogenomaleas 1559
Domperidonum 1562
1998 Dopamini hydrochloridum 1564
N Dosulepini hydrochloridum 1566
Doxepini hydrochloridum 1570

Doxorubicini hydrochloridum 1572
corr Doxycyclini hyclas 1575
Doxycyclinum 1579
Droperidolum 1583
Econazoli nitras 1587
Emetini dihydrochloridum heptahydricum 1589
Emetini dihydrochloridum pentahydricum 1591
1998 Enoxaparinum natricum 1593
Ephedrini hydrochloridum 1595
Ephedrini racemici hydrochloridum 1597
Ephedrinum 1599
Ephedrinum hemihydricum 1601
Epinephrini hydrogenotartras 1603
N Equiseti herba 1605
Ergocalciferolum 1607
Ergometrini hydrogenomaleas 1610
Ergotamini tartras 1612
Erythromycini estolas 1615
Erythromycini ethylsuccinas 1617
Erythromycini lactobionas 1619
Erythromycini stearas 1624
Erythromycinum 1626
Estradioli benzoas 1630
Estradiolum hemihydricum 1632
Ethambutoli hydrochloridum 1634
Ether anestheticus 1635
Ether solvens 1637
corr Ethinylestradiolum 1638
Ethionamidum 1640
Ethisteronum 1641
Ethosuximidum 1643
1998 Ethylcellulosum 1645
Ethylendiaminum 1648
Ethylenglycoli monostearas 1649
Ethylis acetas 1651
N Ethylis biscoumacetas 1653
Ethylmorphini hydrochloridum 1655
Ethylparabenum 1657
1998 Etofyllinum 1659
Etoposidum 1661
1998 Eucalypti etheroleum 1665
Eugenolum 1667
N Fagi pix 1669
Famotidinum 1670
N Farfarae folium 1673
Felodipinum 1675

Fenoteroli hydrobromidum 1678
corr Fentanyli dihydrogenocitras 1681
Ferrosi fumaras 1684
Ferrosi gluconas 1686
Ferrosi sulfas 1688
Fibrini glutinum 1690
1998 Flucloxacillinum natricum 1693
Flucytosinum 1697
Fludrocortisoni acetas 1699
Flunitrazepamum 1702
Fluocinoloni acetonidum 1704
1998 Fluoresceinum natricum 1706
Fluorouracilum 1709
Fluoxetini hydrochloridum 1711
Fluphenazini decanoas 1714
Fluphenazini dihydrochloridum 1717
Fluphenazini enantas 1719
Flurazepami hydrochloridum 1721
Foeniculi amari fructus 1723
Foeniculi dulcis fructus 1725
N Foeniculi etheroleum 1727
corr Formaldehydi solutio 35% 1728
1998 Framycetini sulfas 1730
1998 Frangulae cortex 1733
Fructosum 1735
Furosemidum 1737
N Galla 1741
Gallamini triethiodidum 1743
Gelatina 1745
Gentamicini sulfas 1748
Gentianae radix 1751
N Geranii etheroleum 1753
Glibenclamidum 1755
Glipizidum 1757
Glucagonum 1759
Glucosum 1763
Glucosum monohydricum 1765
Glutethimidum 1767
Glyceroli monostearas 40 - 50 1769
Glycerolum 1771
Glycerolum 85% 1773
corr Glyceromacrogoli 350 cocoas 1775
Glyceromacrogoli hydroxystearas 1777
Glyceromacrogoli ricinoleas 1780
Glycinum 1783
Gonadorelinum 1784
Gonadotropinum chorionicum 1787

Gonadotropinum sericum equinum ad usum veterinarium 1790
Gramicidinum 1791
Griseofulvinum 1793
Guaifenesinum 1795
Guanethidini sulfas 1797
1998 Guar galactomannanum 1798
1998 Haloperidolum 1801
Halothanum 1805
Hamamelidis folium 1807
Harpagophyti radix 1809
N Helianthi oleum 1811
Heparina massae molecularis minoris 1812
Heparinum calcicum 1817
Heparinum natricum 1819
N Hexachlorophenum 1821
Hexobarbitalum 1823
Histamini dihydrochloridum 1824
Histamini phosphas 1826
Histidini hydrochloridum monohydricum 1828
1998 Histidinum 1830
Homatropini hydrobromidum 1832
Homatropini methylbromidum 1834
Hyaluronidasum 1835
Hydralazini hydrochloridum 1837
Hydrargyri dichloridum 1840
1998 Hydrochlorothiazidum 1841
Hydrocortisoni acetas 1844
Hydrocortisoni hemisuccinas 1847
Hydrocortisonum 1850
Hydrogenii peroxidum 30% 1853
Hydrogenii peroxidum 3% 1854
Hydroxocobalamini acetas 1856
Hydroxocobalamini chloridum 1858
Hydroxocobalamini sulfas 1860
1998 Hydroxyethylcellulosum 1862
Hydroxyethylmethylcellulosum 1866
Hydroxypropylcellulosum 1867
1998 Hydroxypropylmethylcellulosi phthalas 1869
Hydroxypropylmethylcellulosum 1871
Hydroxyzini dihydrochloridum 1872
N Hymecromonum 1875
Hyoscyami folium 1877
Hyoscyamini sulfas 1879
N Hyperici herba 1881

Ibuprofenum 1883
Ichthammolum 1885
Idoxuridinum 1887
Imipramini hydrochloridum 1889
Indapamidum 1891
Indometacinum 1894
Insulinum 1896
corr Insulinum humanum 1900
Interferoni alfa-2 solutio concentrata 1904
Iodum 1910
Iohexolum 1911
Iopamidolum 1916
corr Ipecacuanhae radix 1920
corr Ipratropii bromidum 1922
Isoconazoli nitras 1924
Isoconazolum 1927
Isoleucinum 1930
Isoniazidum 1932
Isoprenalini sulfas 1934
Isopropylis myristas 1935
Isopropylis palmitas 1937
Isosorbidi dinitras dilutus 1938
corr Isosorbidi mononitras dilutus 1942
Isotretinoinum 1945
Isoxsuprini hydrochloridum 1948
N Juniperi fructus 1951
Kalii acetas 1953
Kalii aluminii sulfas 1954
Kalii bromidum 1955
N Kalii carbonas 1956
Kalii chloridum 1958
Kalii citras 1959
corr Kalii clavulanas 1961
Kalii dihydrogenophosphas 1965
Kalii hydrogenocarbonas 1966
Kalii hydrogenophosphas 1967
Kalii hydroxidum 1969
Kalii iodidum 1971
N Kalii natrii tartras 1972
N Kalii nitras 1973
N Kalii perchloras 1975
Kalii permanganas 1976
Kalii sorbas 1977
Kanamycini monosulfas 1978
Kanamycini sulfas acidus 1981
Kaolinum ponderosum 1983

Ketamini hydrochloridum 1985
Ketoconazolum 1987
Ketoprofenum 1990
1998 Labetaloli hydrochloridum 1995
Lacca 1998
Lactosum 2000
Lactosum monohydricum 2002
Lactulosi solutio 2004
Lanatosidum C 2007
Lauromacrogolum 2009
Leucinum 2012
Levamisoli hydrochloridum 2014
1998 Levistici radix 2016
Levodopum 2017
Levomentholum 2019
Levomepromazini hydrochloridum 2021
Levomepromazini hydrogenomaleas 2023
Levonorgestrelum 2025
Levothyroxinum natricum 2026
N Lichen islandicus 2029
corr Lidocaini hydrochloridum 2030
Lidocainum 2032
Lincomycini hydrochloridum monohydricum 2033
Lindanum 2036
N Lini oleum 2037
Lini semen 2038
Liothyroninum natricum 2039
1998 Liquiritiae radix 2042
corr Lisinoprilum dihydricum 2044
N Lithanthracis pix 2047
Lithii carbonas 2048
Lithii citras 2050
1998 Lomustinum 2051
Loperamidi hydrochloridum 2054
Lorazepamum 2056
1998 Lupuli flos 2058
Lynestrenolum 2060
Lysini hydrochloridum 2061
N Macidis etheroleum 2065
Macrogolum 300 2066
Macrogolum 400 2068
Macrogolum 1000 2070
Macrogolum 1500 2072
Macrogolum 3000 2074
Macrogolum 4000 2076
Macrogolum 6000 2078

Macrogolum 20 000 2080
Macrogolum 35 000 2082
Magnesii chloridum hexahydricum 2084
Magnesii hydroxidum 2086
N Magnesii lactas dihydricus 2087
Magnesii oxidum leve 2088
Magnesii oxidum ponderosum 2090
N Magnesii peroxidum 2091
Magnesii stearas 2093
Magnesii subcarbonas levis 2094
Magnesii subcarbonas ponderosus 2095
Magnesii sulfas 2097
Magnesii trisilicas 2098
Mannitolum 2099
N Marrubii herba 2102
Matricariae flos 2104
Maydis amylum 2106
Mebendazolum 2107
Meclozini dihydrochloridum 2108
N Medosulepini hydrochloridum 2110
Medroxyprogesteroni acetas 2113
N Megluminum 2115
N Melissae herba 2116
Menadionum 2118
Menthae piperitae etheroleum 2119
Menthae piperitae folium 2122
N Menthae piperitae herba 2124
Mentholum racemicum 2126
Meprobamatum 2128
Mepyramini hydrogenomaleas 2129
Mercaptopurinum 2131
Mestranolum 2133
1998 Metformini hydrochloridum 2134
Methadoni hydrochloridum 2137
Methaqualonum 2139
Methioninum 2141
Methioninum racemicum 2143
Methotrexatum 2144
Methylatropini bromidum 2146
Methylatropini nitras 2148
Methylcellulosum 2150
Methyldopum 2151
Methyleni chloridum 2153
Methylis salicylas 2155
Methylparabenum 2156
Methylphenobarbitalum 2158
Methylprednisoloni acetas 2160

corr Methylprednisoloni hydrogenosuccinas 2163
Methylprednisolonum 2166
N Methylrosanilinii chloridum 2171
Methyltestosteronum 2172
Methylthioninii chloridum ad usum externum 2174
Metoclopramidi hydrochloridum 2176
Metoprololi tartras 2178
1998 Metrifonatum 2181
Metronidazoli benzoas 2184
Mexiletini hydrochloridum 2186
Metronidazolum 2189
Mianserini hydrochloridum 2191
Miconazoli nitras 2193
Miconazolum 2197
Midazolamum 2201
N Millefolii herba 2203
Minocyclini hydrochloridum 2205
Minoxidilum 2208
1998 Morphini hydrochloridum 2210
corr Nadroparinum calcicum 2213
Naloxoni hydrochloridum 2217
Naphazolini hydrochloridum 2218
Naphazolini nitras 2220
Naproxenum 2222
Natrii acetas 2223
Natrii alginas 2225
Natrii amidotrizoas 2227
Natrii benzoas 2229
Natrii bromidum 2231
Natrii calcii edetas 2233
Natrii carbonas 2234
Natrii carbonas decahydricus 2235
Natrii carbonas monohydricus 2236
Natrii cetylo- et stearylosulfas 2237
corr Natrii chloridum 2241
Natrii citras dihydricus 2243
Natrii cyclamas 2245
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus 2247
Natrii disulfis 2249
Natrii fluoridum 2250
Natrii fusidas 2251
Natrii hydrogenocarbonas 2253
Natrii hydrogenophosphas dihydricus 2254
Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus 2256
Natrii hydroxidum 2257
Natrii iodidum 2258
corr Natrii lactatis solutio 2259

1998 Natrii laurilsulfas 2262
1998 Natrii nitroprussias 2263
N Natrii perboras 2265
Natrii picosulfas 2266
Natrii salicylas 2268
Natrii sulfas 2270
Natrii sulfas decahydricus 2271
Natrii sulfis 2272
Natrii sulfis heptahydricus 2273
Natrii tetraboras 2275
Natrii thiosulfas 2276
Natrii valproas 2277
1998 Neomycini sulfas 2280
corr Neostigmini bromidum 2283
Neostigmini metilsulfas 2284
Nicethamidum 2286
Niclosamidum 2288
Niclosamidum monohydricum 2290
Nicotinamidum 2292
Nifedipinum 2294
Nitrazepamum 2296
Nitrofuralum 2298
Nitrofurantoinum 2300
1998 Nitrogenii oxidum 2301
1998 Nitrogenum 2304
Norepinephrini hydrochloridum 2306
Norepinephrini hydrogenotartras 2308
Norethisteronum 2310
Norethisteroni acetas 2312
Norgestrelum 2315
Nortriptylini hydrochloridum 2317
Noscapini hydrochloridum 2319
Noscapinum 2321
1998 Nystatinum 2322
Octyldodecanolum 2325
Oleomacrogolum 2326
1998 Olivae oleum 2329
Omeprazolum 2331
Omeprazolum natricum 2334
N Ononidis radix 2336
Opium crudum 2337
Orciprenalini sulfas 2340
N Ornidazolum 2343
Oryzae amylum 2345
Ouabainum 2346
Oxazepamum 2348
Oxprenololi hydrochloridum 2350

1998 Oxygenum 2352
Oxymetazolini hydrochloridum 2353
Oxyphenbutazonum 2355
Oxytetracyclinum 2357
Oxytetracyclini hydrochloridum 2360
1998 Oxytocini solutio concentrata 2363
1998 Oxytocinum 2367
corr Pancreatis pulvis 2373
Pancuronii bromidum 2378
Papaverini hydrochloridum 2380
corr Paracetamolum 2381
Paraffinum liquidum 2383
Paraffinum perliquidum 2385
Paraffinum solidum 2386
Paraldehydum 2387
1998 Penicillaminum 2388
Pentamidini diisetionas 2392
Pentobarbitalum 2394
Pentobarbitalum natricum 2396
Pentoxifyllinum 2398
Pepsini pulvis 2400
Perphenazinum 2402
Pethidini hydrochloridum 2404
N Petroselini radix 2405
Phenacetinum 2407
Phenazonum 2408
Phenobarbitalum 2410
Phenobarbitalum natricum 2412
Phenolsulfonphthaleinum 2414
Phenolum 2415
Phenoxyethanolum 2417
Phenoxymethylpenicillinum 2419
Phenoxymethylpenicillinum kalicum 2421
Phentolamini mesilas 2424
Phenylalaninum 2426
Phenylbutazonum 2428
Phenylephrini hydrochloridum 2430
Phenylephrinum 2432
Phenylhydrargyri boras 2434
Phenylhydrargyri nitras 2435
Phenylpropanolamini hydrochloridum 2436
Phenytoinum natricum 2438
Pholcodinum 2440
Phthalylsulfathiazolum 2441
Physostigmini salicylas 2443
Physostigmini sulfas 2445
Phytomenadionum 2447

Pilocarpini hydrochloridum 2450
Pilocarpini nitras 2451
Pindololum 2453
N Pini pumilionis etheroleum 2455
Piperazini adipas 2457
Piperazini citras 2459
Piperazinum hexahydricum 2461
Piroxicamum 2463
1998 Pivampicillinum 2465
N Plantaginis folium 2469
Plasma humanum ad separationem 2471
N Plumbi acetas 2473
Polyacrylatis dispersio 30% 2474
Polygalae radix 2476
N Polygoni avicularis herba 2477
corr Polymyxini B sulfas 2479
Polysorbatum 20 2481
N Polysorbatum 40 2482
Polysorbatum 60 2484
corr Polysorbatum 80 2485
Povidonum 2487
Povidonum iodinatum 2490
Praziquantelum 2492
1998 Prazosini hydrochloridum 2495
1998 Prednisoloni acetas 2498
1998 Prednisoloni natrii phosphas 2501
Prednisoloni pivalas 2504
Prednisolonum 2506
Prednisonum 2510
Primaquini diphosphas 2513
Primidonum 2515
N Primulae radix 2517
Probenecidum 2518
Procainamidi hydrochloridum 2520
1998 Procaini benzylpenicillinum 2521
Procaini hydrochloridum 2525
Prochlorperazini hydrogenomaleas 2527
Progesteronum 2529
Prolinum 2530
1998 Promethazini hydrochloridum 2532
Propanthelini bromidum 2535
Propranololi hydrochloridum 2537
Propylenglycoli monostearas 2539
Propylenglycolum 2542
Propylis gallas 2543
Propylparabenum 2545
Propylthiouracilum 2547

Propyphenazonum 2549
1998 Protamini hydrochloridum 2550
1998 Protamini sulfas 2553
corr Protirelinum 2555
1998 Proxyphyllinum 2558
Psyllii semen 2560
Pyrazinamidum 2561
Pyridoxini hydrochloridum 2563
Pyrimethaminum 2565
N Quercus cortex 2567
Quinidini sulfas 2569
1998 Quinini hydrochloridum 2571
1998 Quinini sulfas 2574
Ranitidini hydrochloridum 2577
Ratanhiae radix 2579
Reserpinum 2581
Resorcinolum 2583
1998 Rhamni purshianae cortex 2584
Rhei radix 2587
1998 Riboflavini natrii phosphas 2590
Riboflavinum 2593
Ricini oleum 2595
Rifampicinum 2596
1998 Rifamycinum natricum 2598
N Rosmarini etheroleum 2601
Roxithromycinum 2603
Saccharinum 2609
Saccharinum natricum 2611
1998 Saccharosum 2613
1998 Salbutamoli sulfas 2615
1998 Salbutamolum 2617
N Salviae folium 2619
N Salviae herba 2620
1998 Sambuci flos 2622
Scopolamini hydrobromidum 2624
Selenii disulfidum 2626
1998 Sennae folium 2627
1998 Sennae fructus acutifoliae 2629
1998 Sennae fructus angustifoliae 2631
Serinum 2633
Sertaconazoli nitras 2635
1998 Sesami oleum 2638
Silica colloidalis anhydrica 2640
Silica colloidalis hydrica 2641
N Sinapis etheroleum artificiale 2643
1998 Solani amylum 2644

Somatostatinum 2645
Somatropini solutio ad praeparationem 2649
Somatropinum 2653
Sorbitani lauras 2658
Sorbitani oleas 2659
Sorbitani palmitas 2660
Sorbitani stearas 2661
Sorbitani trioleas 2662
Sorbitolum 2663
Sorbitolum 70% cristallisabile 2665
Sorbitolum 70% non cristallisabile 2666
Spectinomycini hydrochloridum 2668
Spiramycinum 2672
Spironolactonum 2674
Stramonii folium 2676
Streptokinasum 2679
Streptomycini sulfas 2682
N Strychni semen 2685
Succinylsulfathiazolum 2686
Sulfacetamidum natricum 2688
Sulfadiazinum 2690
Sulfadimidinum 2692
Sulfadoxinum 2694
Sulfafurazolum 2696
Sulfamerazinum 2698
Sulfamethizolum 2700
Sulfamethoxazolum 2701
Sulfamethoxypyridazinum 2703
1998 Sulfasalazinum 2705
Sulfathiazolum 2707
Sulfinpyrazonum 2709
Sulfisomidinum 2711
1998 Sulfur ad usum externum 2713
1998 Sulindacum 2714
Sulpiridum 2717
N Suxamethonii chloridum 2720
Suxamethonii jodidum 2721
Talcum 2725
Tamoxifeni dihydrogenocitras 2727
N Tanninum 2729
N Taraxaci radix cum herba 2730
Temazepamum 2731
1998 Tenoxicamum 2733
Terbutalini sulfas 2735
Terebinthinae etheroleum rectificatum 2737
Terfenadinum 2738
Testosteroni enantas 2741

Testosteroni propionas 2743
Tetracaini hydrochloridum 2745
Tetracosactidum 2747
Tetracyclini hydrochloridum 2752
Tetracyclinum 2756
Theobrominum 2759
Theophyllinum 2760
Theophyllinum monohydricum 2762
Thiamini hydrochloridum 2764
Thiamini nitras 2765
Thiamphenicolum 2767
Thiopentalum natricum et natrii carbonas 2769
Thioridazini hydrochloridum 2771
Threoninum 2772
Thymi herba 2774
Thymolum 2776
Tiabendazolum 2778
1998 Ticarcillinum natricum 2780
Ticlopidini hydrochloridum 2784
Tiliae flos 2787
Timololi hydrogenomaleas 2788
Tinidazolum 2790
Titanii dioxidum 2792
Tobramycinum 2794
Tocoferoli alfa acetas 2796
Tocoferoli alfa acetatis pulvis 2799
Tocoferolum alfa 2802
Tolbutamidum 2805
Tolnaftatum 2807
N Tormentillae radix 2809
Tosylchloramidum natricum 2811
Tragacantha 2812
Tretinoinum 2814
Triacetinum 2816
1998 Triamcinoloni acetonidum 2818
1998 Triamcinoloni hexacetonidum 2821
Triamterenum 2823
Trifluoperazini hydrochloridum 2824
N Trifolii fibrini folium 2826
Triglycerida saturata media 2828
N Trimecaini hydrochloridum 2830
Trimethadionum 2832
Trimethoprimum 2833
Trimipramini hydrogenomaleas 2835
1998 Tritici amylum 2837
N Trolaminum 2838
Trometamolum 2840

Tropicamidum 2842
N Troxerutinum 2844
Trypsinum 2846
1998 Tryptophanum 2849
Tubocurarini chloridum 2855
Tyrosinum 2857
Urea 2861
Urofollitropinum 2862
Urokinasum 2865
Uvae ursi folium 2868
1998 Valerianae radix 2871
Valinum 2872
Vancomycini hydrochloridum 2875
Vanillinum 2878
N Vaselinum album 2879
N Vaselinum flavum 2880
Verapamili hydrochloridum 2882
N Veratri albi radix 2884
N Verbasci flos 2885
Vinblastini sulfas 2887
Vincristini sulfas 2889
Vitamini A pulvis 2891
Vitaminum A 2893
Vitaminum A densatum oleosum 2894
Vitaminum A in aqua dispergibile 2896
Warfarinum natricum 2899
Warfarinum natricum clathratum 2901
N Xantinoli nicotinas 2903
Xylometazolini hydrochloridum 2905
Zidovudinum 2909
Zinci chloridum 2912
Zinci oxidum 2913
Zinci stearas 2914
Zinci sulfas heptahydricus 2916
Zinci undecylenas 2917
1998 Zopiclonum 2918
6.2 Léčivé přípravky 2923
6.2.1 Obecné články lékových forem 2923
Auricularia 2923
Capsulae 2925
Emplastra transcutanea 2928
Extracta 2929
Granula 2932
Immunosera ad usum humanum 2934
Immunosera ad usum veterinarium 2936

Inhalanda 2938
Liquida ad usum dermicum 2942
Liquida peroralia 2943
Nasalia 2945
corr Ocularia 2948
Parenteralia 2951
Praademixta ad alimenta medicata ad usum veterinarium 2955
Praeparata ad irrigationem 2956
Praeparata homeopathica 2957
Praeparata insulini iniectabilia 2958
Praeparata intramammariae ad usum veterinarium 2962
Praeparata pharmaceutica in vasis cum pressu 2963
Producta ab ADN recombinante 2964
Producta allergenica 2968
Pulveres adspersorii 2972
Pulveres perorales 2973
Rectalia 2974
Species 2977
Spumae medicatae 2978
Styli 2980
1998 Tabulettae 2980
Tampona medicata 2985
Tincturae 2985
Unguenta 2986
Vaccina ad usum humanum 2989
Vaccina ad usum veterinarium 2991
Vaginalia 2998
6.2.2 Jednotlivé léčivé přípravky 3001
Albumini humani solutio 3001
Aloe extractum siccum normatum 3003
Antithrombinum III humanum densatum cryodesiccatum 3005
Belladonnae pulvis normatus 3008
Factor VIII coagulationis sanguinis humani cryodesiccatus 3010
Factor IX coagulationis sanguinis humani cryodesiccatus 3012
Fibrinogenum humanum cryodessicatum 3015
Hyoscyami pulvis normatus 3017
Immunoglobulinum humanum anti-D 3019
Immunoglobulinum humanum hepatitidis A 3021
Immunoglobulinum humanum hepatitidis B 3022
Immunoglobulinum humanum hepatitidis B ad usum intravenosum 3022
Immunoglobulinum humanum morbillicum 3023
Immunoglobulinum humanum normale 3024
Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum 3027
Immunoglobulinum humanum rabicum 3030
Immunoglobulinum humanum rubellae 3033
Immunoglobulinum humanum tetanicum 3034
Immunoglobulinum humanum varicellae 3035

Immunoserum botulinicum 3036
Immunoserum clostridii novyi alpha ad usum veterinarium 3038
Immunoserum clostridii perfringentis beta ad usum veterinarium 3040
Immunoserum clostridii perfringentis epsilon ad usum veterinarium 3042
Immunoserum contra venena viperarum europaearum 3044
Immunoserum diphthericum 3045
Immunoserum erysipelatis suillae 3047
Immunoserum gangraenicum (Clostridium novyi) 3048
Immunoserum gangraenicum (Clostridium perfringens) 3050
Immunoserum gangraenicum (Clostridium septicum) 3052
Immunoserum gangraenicum mixtum 3054
Immunoserum tetanicum ad usum humanum 3054
Immunoserum tetanicum ad usum veterinarium 3056
Insulini biphasici iniectio 3058
Insulini isophani biphasici iniectio 3059
Insulini isophani iniectio 3060
Insulini solubilis iniectio 3061
Insulini zinci amorphi iniectio in suspensione 3061
Insulini zinci cristallisati iniectio in suspensione 3062
Insulini zinci iniectio in suspensione 3063
Ipecacuanhae pulvis normatus 3064
Lypressini solutio iniectabilis 3066
Solutiones ad haemocolaturam 3068
corr Solutiones ad haemodialysim 3072
corr Solutiones ad haemodialysim, Aqua ad concetratas solutiones
diluendas haemodialysi 3076
Solutiones ad peritonealem dialysim 3079
Solutiones anticoagulantes et sanguinem humanum conservantes 3083
Somatropinum pro iniectione 3088
Stramonii pulvis normatus 3093
Tuberculini aviarii derivatum proteinosum purificatum 3095
Tuberculini bovini derivatum proteinosum purificatum 3097
Tuberculini derivatum proteinosum purificatum ad usum humanum 3099
Tuberculinum pristinum ad usum humanum 3101
Vaccinum anthracis vivum ad usum veterinarium 3103
Vaccinum aphtharum epizooticarum inactivatum ad ruminantes 3104
Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae inactivatum 3106
Vaccinum bronchitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum 3109
Vaccinum brucellosis (Brucella melitensis stirpe rev. 1)
vivum cryodesiccatum ad usum veterinarium 3111
Vaccinum bursitidis infectivae aviariae inactivatum 3113
Vaccinum bursitidis infectivae aviariae vivum cryodesiccatum 3115
Vaccinum calicivirosis felinae inactivatum 3117
Vaccinum calicivirosis felinae vivum cryodesiccatum 3119
Vaccinum cholerae 3121
Vaccinum cholerae cryodesiccatum 3122
Vaccinum clostridii botulini ad usum veterinarium 3124

Vaccinum clostridii chauvoei ad usum veterinarium 3125
Vaccinum clostridii novyi B ad usum veterinarium 3126
Vaccinum clostridii perfringentis ad usum veterinarium 3128
Vaccinum clostridii septici ad usum veterinarium 3131
Vaccinum colibacillosis fetus a partu recentis inactivatum ad ruminantes 3133
Vaccinum colibacillosis fetus a partu recentis inactivatum ad suem 3135
Vaccinum diphtheriae adsorbatum 3137
Vaccinum diphtheriae adulti et adulescentis adsorbatum 3140
Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum 3142
Vaccinum diphtheriae et tetani adulti et adulescentis adsorbatum 3145
Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis adsorbatum 3148
Vaccinum encephalomyelitidis infectivae aviariae vivum 3152
Vaccinum erysipelatis suillae inactivatum 3154
Vaccinum febris flavae vivum 3156
Vaccinum febris typhoidis 3160
Vaccinum febris typhoidis cryodessicatum 3161
Vaccinum febris typhoidis polysaccharidicum 3162
Vaccinum febris typhoidis vivum perorale (stirpe Ty 21a) 3165
Vaccinum hepatitidis A inactivatum 3167
Vaccinum hepatitidis B (ADNr) 3171
Vaccinum hepatitidis contagiosae caninae vivum cryodesiccatum 3175
Vaccinum influenzae equi inactivatum 3177
Vaccinum influenzae inactivatum ad suem 3179
Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum 3181
Vaccinum influenzae inactivatum ex viris integris praeparatum 3185
Vaccinum influenzae inactivatum ex virorum fragmentis praeparatum 3188
Vaccinum laryngotracheitidis infectivae aviariae vivum ad pullum 3191
Vaccinum leptospirosis ad usum veterinarium 3194
Vaccinum meningococcale polysaccharidicum 3195
Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem inactivatum 3199
Vaccinum morbi Aujeszkyi ad suem vivum cryodesiccatum
ad usum parenterale 3201
Vaccinum morbi Carrei vivum cryodesiccatum pro cane 3204
Vaccinum morbi Carrei vivum cryodesiccatum pro mustelidis 3206
Vaccinum morbi Marek vivum 3208
Vaccinum morbillorum, parotitidis et rubellae vivum 3210
Vaccinum morbillorum vivum 3212
Vaccinum panleucopeniae felinae inactivatum 3215
Vaccinum panleucopeniae felinae infectivae vivum ryodesiccatum 3217
Vaccinum parotitidis vivum 3218
Vaccinum parvovirosis caninae inactivatum 3221
Vaccinum parvovirosis caninae vivum 3223
Vaccinum parvovirosis inactivatum ad suem 3225
Vaccinum pertussis 3227
Vaccinum pertussis adsorbatum 3229
Vaccinum pestis classicae suillae vivum cryodesiccatum 3231
Vaccinum pneumococcale polysaccharidicum 3234

Vaccinum poliomyelitidis inactivatum 3237
Vaccinum poliomyelitidis perorale 3238
Vaccinum pseudopestis aviariae inactivatum 3245
Vaccinum pseudopestis aviariae vivum cryodesiccatum 3248
Vaccinum rabiei ex cellulis ad usum humanum 3250
Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium 3253
Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem 3255
Vaccinum rhinotracheitidis infectivae bovinae vivum cryodesccatum 3257
Vaccinum rubellae vivum 3259
Vaccinum tetani adsorbatum 3262
Vaccinum tetani ad usum veterinarium 3264
Vaccinum tuberculosis (BCG) cryodesiccatum 3267
Vaccinum varicellae vivum 3270
Vaccinum variolae gallinaceae vivum cryodesiccatum 3272
6.2.3 Radiofarmaceutické přípravky 3275
corr Radiofarmaca 3275
Aquae tritiatae[^{3}H] solutio iniectabilis 3290
Chromii[^{51}Cr] edetatis solutio iniectabilis 3291
Cyanocobalamini[^{57}Co] capsulae 3292
Cyanocobalamini[^{57}Co] solutio 3294
Cyanocobalamini[^{58}Co] solutio 3296
Fibrinogenum humanum iodinatum[^{125}I] cryodesiccatum 3298
1998 Gallii[^{67}Ga] citratis solutio iniectabilis 3300
Indii[^{111}In]oxini solutio 3301
Indii[^{111}In] pentetatis solutio iniectabilis 3303
Iobenguani[^{123}I] solutio iniectabilis 3305
Iobenguani[^{131}I] solutio iniectabilis ad usum diagnosticum 3307
Iobenguani[^{131}I] solutio iniectabilis ad usum therapeuticum 3309
Natrii chromatis[^{51}Cr] solutio sterilis 3311
Natrii iodidi[^{131}I] capsulae ad usum diagnosticum 3312
Natrii iodidi[^{123}I] solutio 3313
Natrii iodidi[^{125}I] solutio 3315
Natrii iodidi[^{131}I] solutio 3316
Natrii iodohippurati[^{123}I] solutio iniectabilis 3318
Natrii iodohippurati[^{131}I] solutio iniectabilis 3320
Natrii pertechnetatis[^{99m}Tc] fissione formati solutio iniectabilis 3322
Natrii pertechnetatis[^{99m}Tc] sine fissione formati solutio iniectabilis 3324
Natrii phosphatis[^{32}P] solutio iniectabilis 3326
Norcholesteroli iodinati[^{131}I] solutio iniectabilis 3328
Rhenii sulfidi colloidalis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis 3330
Stanni colloidalis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis 3332
Stanni pyrophosphatis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis 3333
Sulfuris colloidalis et technetii[^{99m}Tc] solutio iniectabilis 3336
Technetii[^{99m}Tc] et etifenini solutio iniectabilis 3337
Technetii[^{99m}Tc] gluconatis solutio iniectabilis 3339
Technetii[^{99m}Tc] humani albumini solutio iniectabilis 3341
Technetii[^{99m}Tc] macrosalbi suspensio iniectabilis 3344

1998 Technetii[^{99m}Tc] medronati solutio iniectabilis 3346
Technetii[^{99m}Tc] microsphaerarum suspensio iniectabilis 3349
Technetii[^{99m}Tc] pentetatis solutio iniectabilis 3351
Technetii[^{99m}Tc] succimeri solutio iniectabilis 3353
Thallosi[^{201}Tl] chloridi solutio iniectabilis 3355
Xenoni[^{133}Xe] solutio iniectabilis 3356

Obsah **3359**

Vydává a tiskne: Tiskárna Ministerstva vnitra, p. o., Bartůňkova 4, pošt. schr. 10, 149 01 Praha 415, telefon (02) 792 70 11, fax (02) 795 26 03 – **Redakce**: Ministerstvo vnitra, Nad Štolou 3, pošt. schr. 21/SB, 170 34 Praha 7-Holešovice, telefon: (02) 37 69 71 a 37 88 77, fax (02) 37 88 77 – **Administrace**: písemné objednávky předplatného, změny adres a počtu odebíraných výtisků – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, telefon 0627/305 161, fax: 0627/321 417. Objednávky ve Slovenské republice přijímá a titul distribuuje Magnet-Press Slovakia, s. r. o., Teslova 12, 821 02 Bratislava, tel./fax: 00421 7 525 46 28, 525 45 59. **Roční předplatné** se stanovuje za dodávku kompletního ročníku včetně rejstříku a je od předplatitelů vybíráno formou záloh ve výši oznámené ve Sbírce zákonů. Závěrečné vyúčtování se provádí po dodání kompletního ročníku na základě počtu skutečně vydaných částek (první záloha činí 2300,– Kč) – Vychází podle potřeby – **Distribuce**: celoroční předplatné i objednávky jednotlivých částek – MORAVIAPRESS, a. s., U Póny 3061, 690 02 Břeclav, telefon: 0627/305 179, 305 153, fax: 0627/321 417. – **Drobný prodej – Benešov**: HAAGER – Potřeby školní a kancelářské, Masarykovo nám. 101; **Bohumín**: ŽDB, a. s., technická knihovna, Bezručova 300; **Brno**: GARANCE-Q, Koliště 39, Knihkupectví ČS, Kapucínské nám. 11, Knihkupectví M. Ženíška, Květinářská 1, M.C.DES, Cejl 76, SEVT, a. s., Česká 14; **České Budějovice**: Prospektrum, Kněžská 18, SEVT, a. s., Krajinská 38; **Hradec Králové**: TECHNOR, Hořická 405; AUTOŠKOLA, Pospíšil Jaroslav, Velké nám. 132; **Chomutov**: DDD Knihkupectví-Antikvariát, Ruská 85; **Jihlava**: VIKOSPOL, Smetanova 2; **Kadaň**: Knihařství – Přibíková, J. Švermy 14; **Kladno**: eL VaN, Ke Stadionu 1953; **Klatovy**: Krameriovo knihkupectví, Klatovy 169/I.; **Kolín 1**: Knihkupectví U Kašků, Karlovo nám. 46; **Liberec**: Podještědské knihkupectví, Moskevská 28; **Most**: Kniha M + M, Lipová 806, Knihkupectví Růžička, Šeříková 529/1057; **Olomouc**: BONUM, Ostružnická 10, Tycho, Ostružnická 3; **Ostrava**: LIBREX, Nádražní 14, Profesio, Hollarova 14, SEVT, a. s., Dr. Šmerala 27; **Pardubice**: LEJHANEC, s. r. o., Sladkovského 414, Knihkupectví Z. Petrová, Pasáž Sv. Jana a Za Pasáží; **Plzeň**: ADMINA, Úslavská 2, EDICUM, Vojanova 45, Technické normy, Lábkova pav. č. 5; **Praha 1**: ALBERTNET, Revoluční 1/655, FIŠER-KLEMENTINUM, Karlova 1, LINDE Praha, a. s., Opletalova 35, NADATUR, Hybernská 5, PROSPEKTRUM, Na Poříčí 7; **Praha 2**: B. Wellemínová, Dittrichova 13; **Praha 4**: Abonentní tiskový servis, Zdiměřická 1446/9, PROSPEKTRUM, Nákupní centrum, Budějovická, SEVT, a. s., Jihlavská 405; **Praha 5**: SEVT, a. s., E. Peškové 14; **Praha 6**: PPP – Staňková Isabela, Verdunská 1; **Praha 8**: JASIPA, Zenklova 60; **Praha 10**: BMSS START, areál VÚ JAWA, V Korytech 20; **Přerov**: Knihkupectví EM-ZET, Bartošova 9; **Příbram**: VEMA, Korecká Blanka, Čechovská 138; **Sokolov**: Arbor Sokolov, a. s., Nádražní 365; **Šumperk**: Knihkupectví D-G, Hlavní tř. 23; **Teplice**: L + N knihkupectví, Kapelní 4; **Trutnov**: Galerie ALFA, Bulharská 58; **Ústí nad Labem**: 7 RX, s. r. o., Mírová 4, tel.: 047/44 249, 44 252, 44 253; **Zábřeh**: Knihkupectví PATKA, Žižkova 45; **Zlín-Louky**: INFOSERVIS, areál Telekomunikačních montáží; **Zlín-Malenovice**: Ing. M. Kučeřík, areál HESPO; **Znojmo**: Knihkupectví Houdková, Divišovo nám. 12; **Žatec**: Prodejna U Pivovaru, Žižkovo nám. 76. **Distribuční podmínky předplatného**: jednotlivé částky jsou expedovány neprodleně po dodání z tiskárny. Objednávky nového předplatného jsou vyřizovány do 15 dnů a pravidelné dodávky jsou zahajovány od nejbližší částky po ověření úhrady předplatného nebo jeho zálohy. Částky vyšlé v době od zaevidování předplatného do jeho úhrady jsou doposílány jednorázově. Změny adres a počtu odebíraných výtisků jsou prováděny do 15 dnů. **Reklamace**: informace na tel. čísle 0627/305 168. V písemném styku vždy uvádějte IČO (právnická osoba), rodné číslo (fyzická osoba). **Podávání novinových zásilek** povoleno Českou poštou, s. p., Odštěpný závod Jižní Morava Ředitelství v Brně č. j. P/2-4463/95 ze dne 8. 11. 1995.